

MORPHOGENESE VON PESTIVIREN

STEFANIE SCHMEISER

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 2010

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 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

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

www.doktorverlag.de

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

Betreuer: Prof. Dr. H.-J. Thiel

Morphogenese von Pestiviren

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

gingereicht von
Stefanie Schmeiser
Tierärztin aus Köln

Giessen 2010

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

Dekan: Prof. Dr. M. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. H.-J. Thiel
Prof. Dr. M. Reinacher

Tag der Disputation: 06.12.2010

Ich erkläre:

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

Stefanie Schmeiser

*May it be an evening star
Shines down upon you
May it be when darkness falls
Your heart will be true
You walk a lonely road
Oh! How far you are from home.*

*Mornie utúlië
Believe and you will find your way
Mornie alantië
A promise lives within you now.*

*May it be the shadows call
Will fly away
May it be your journey on
To light the day
When the night is overcome
You may rise to find the sun.*

aus: May it be (Enya)

I. Inhaltsverzeichnis

I.	INHALTSVERZEICHNIS	1
II.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	5
III.	TABELLENVERZEICHNIS	6
IV.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	7
1	EINLEITUNG.....	11
1.1	Taxonomie von Pestiviren	11
1.2	Wirtsspektrum, Pathogenese und Klinik	12
1.2.1	Bovines Virus Diarrhöe Virus 1 und 2 (BVDV-1 und -2)	13
1.2.2	Border Disease Virus der Schafe (BDV).....	14
1.2.3	Klassisches Schweinepest Virus (KSPV).....	14
1.3	Virusaufbau und Genomorganisation.....	14
1.4	Translation und Funktionen der viralen Proteine	15
1.5	Biotypen	18
1.6	Replikation und Virusmorphogenese	18
1.7	Replikationsort und Morphogenese von Flaviviren	19
1.8	Replikationsort und Morphogenese von Hepaciviren	20
1.9	Der sekretorische Weg der Zelle	22
1.10	Ultrahistologische Darstellung der Morphogenese von Pestiviren	24
1.11	Einsatz der Elektronenmikroskopie (EM) in der Zellbiologie	25
2	ZIELSETZUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT.....	28
3	MATERIAL UND METHODEN.....	29
3.1	Material.....	29
3.1.1	Zellen	29
3.1.2	Virusstämme	29
3.1.3	Antikörper und Seren	30
3.1.3.1	Primär-Antikörper	30
3.1.3.2	Sekundär-Antikörper/ Protein A Gold.....	31
3.1.4	Enzyme	32
3.1.5	Oligonukleotide und Sonden	32

3.1.6	Vorgefertigte Medien und Systeme	32
3.1.7	Chemikalien und Reagenzien.....	33
3.1.8	Puffer, Lösungen und Harze	33
3.1.9	Medien und Mediumzusätze für die Zellkultur.....	34
3.1.10	Fotodokumentation	34
3.1.11	Geräte	35
3.2	Methoden	36
3.2.1	Zellkulturtechniken	36
3.2.1.1	Haltung der Zelllinien	36
3.2.1.2	Bestimmung der Zellzahl	36
3.2.1.3	Kryokonservierung von Zellen	37
3.2.2	Herstellung von Virusstocks	37
3.2.3	Titration von Pestiviren.....	37
3.2.4	Indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT)	38
3.2.5	Infektions- und Expressionsmodelle.....	39
3.2.5.1	Infektionsversuche zur Erstellung von Wachstumskurven.....	39
3.2.5.2	Infektionsversuche zur Einbettung für die Elektronenmikroskopie	40
3.2.5.3	Transfektionsversuche zur Erstellung von Wachstumskurven und zur Einbettung für die Elektronenmikroskopie.....	40
3.2.5.3.1	Präparation der RNS	41
3.2.5.3.2	Elektroporation	42
3.2.5.4	Expression pestiviraler Strukturproteine mit dem Tet-on Expressionssystem	42
3.2.5.5	Baculovirus-Expressionsversuche für den IIFT und zur Einbettung für die Elektronenmikroskopie	43
3.2.6	Kinetik der Virusvermehrung	44
3.2.7	Quantitative real time Polymerase Kettenreaktion (qrt PCR).....	44
3.2.7.1	RNS-Präparation aus Zellen für die real time PCR	44
3.2.7.2	Reverse Transkription (RT)	44
3.2.7.3	qrt PCR.....	45
3.2.8	Einbettungsverfahren für die Elektronenmikroskopie	46
3.2.8.1	Epoxid Kunstharz-Einbettung.....	46
3.2.8.1.1	Blockeinbettung	46
3.2.8.1.2	Flacheinbettung von doppeltem Monolayer („Sandwich“-Methode).....	47
3.2.8.1.3	Direkte Flacheinbettung von einfachem Monolayer.....	48

3.2.8.2	„LR-Gold“ Acrylharz-Einbettung	49
3.2.8.3	Gefriereinbettung.....	50
3.2.9	Anfertigung von Ultradünnschnitten.....	51
3.2.9.1	Präparation von Objektträgern (Netzchen) für die Elektronenmikroskopie.....	51
3.2.9.2	Ultramikrotomie bei Raumtemperatur.....	52
3.2.9.3	Kryoultramikrotomie nach TOKUYASU	52
3.2.10	Indirekte Immunogoldmarkierung.....	53
3.2.10.1	„Pre-Embedding“ Markierung an Kunstharzschnitten.....	53
3.2.10.2	„Post-Embedding“ Markierungen an Kunstharzschnitten.....	54
3.2.10.3	„Post-Embedding“ Markierung von Gefrierschnitten	55
3.2.11	Elektronenmikroskopische Untersuchung.....	56
3.2.12	Fotodokumentation und –bearbeitung	57
4	ERGEBNISSE.....	58
4.1	Auswahl geeigneter Infektionsmodelle (Vorversuche).....	58
4.1.1	Auswahl und Herstellung geeigneter Virusstocks verschiedener Pestiviren.....	58
4.1.2	Erstellung von Virusvermehrungskinetiken	59
4.1.2.1	Infektionsmodelle	60
4.1.2.2	Transfektionsmodelle	60
4.1.2.3	Erstellung von Wachstumskurven zur Untersuchung der initialen Virusvermehrung	61
4.1.2.4	Quantitative real time PCR zum Nachweis der Virusreplikation.....	64
4.1.2.4.1	Validierung der quantitativen real time PCR	66
4.1.2.4.2	Relative Quantifizierung der Pestivirus RNS aus den Infektionsversuchen	68
4.1.3	Erarbeitung der Infektionsmodelle für ultrahistologische Untersuchungen.....	70
4.2	Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Darstellung von Viruspartikeln (Ultrahistologie)	71
4.2.1	Probenpräparation.....	71
4.2.2	Elektronenmikroskopische Auswertung.....	73
4.2.2.1	Infektionsmodell BVDV-1 „NADL“	75
4.2.2.2	Infektionsmodell BVDV-2 „890“	75
4.2.2.3	Infektionsmodell „Giraffe-1“	77
4.2.2.4	Transfektionsmodell BVDV-1 „cp7“	82
4.2.3	Zusammenfassung der EM-Ergebnisse zur Darstellung von Pestivirionen	83

4.3	Elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Nachweis von Virusproteinen (Immun-Ultrahistologie)	84
4.3.1	Immunogoldmarkierungen an Kunstharzschnitten	84
4.3.1.1	„Pre-Embedding“ Immunmarkierungen an mit Pestiviren infizierten Zellen	84
4.3.1.2	„Post-Embedding“-Immunmarkierungen	85
4.3.1.2.1	Markierung von E2 im Baculovirus-Expressionssystem	86
4.3.1.2.2	Markierung von E2 im Tet-on Expressionssystem	87
4.3.2	Immunogoldmarkierungen an Kryodünnschnitten nach TOKUYASU	90
4.3.2.1	Markierungsversuche zur Etablierung der Immunogoldmarkierung an Gefrierdünnschnitten.....	91
4.3.2.1.1	Markierungsversuche am Infektionsmodell Tollwutvirusstamm „CVS“ und BHK- 21 Zellen	91
4.3.2.1.2	Markierung von E2 im Tet-on Expressionssystem	93
4.3.2.2	Markierungsversuche an verschiedenen Pestivirus-Infektionsmodellen.....	95
4.3.2.2.1	Nachweis des Kapsidproteins in der IEM an Kryodünnschnitten	99
4.3.2.2.2	Nachweis des Strukturproteins E ^{ms} in der IEM an Kryodünnschnitten.....	99
4.3.2.2.3	Nachweis des Strukturproteins E1 in der IEM an Kryodünnschnitten	99
4.3.2.2.4	Nachweis des Strukturproteins E2 in der IEM an Kryodünnschnitten	100
4.3.2.2.5	Nachweis der Nicht-Strukturproteine in der IEM an Kryodünnschnitten	100
4.3.2.2.6	Nachweis von Doppelstrang RNS in der IEM an Kryodünnschnitten.....	100
4.3.2.2.7	Zusammenfassung der IEM Ergebnisse an Gefrierdünnschnitten.....	101
5	DISKUSSION.....	108
5.1	Einsatz verschiedener EM-Einbettungstechniken für die Untersuchungen zur Pestivirusmorphogenese.....	108
5.2	Ultrahistologische Untersuchungen zur Morphogenese von Pestiviren	111
5.3	Modell zur Morphogenese von Pestiviren	114
5.4	Morphologie von Pestiviren.....	119
5.5	Replikationsort von Pestiviren	120
5.6	Die Rolle des endosomalen Kompartiments bei der Vermehrung von Pestiviren	121
6	ZUSAMMENFASSUNG	127
7	SUMMARY	129
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	131

II. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Genetische Verwandtschaft von Pestiviren.....	12
Abb. 2: Transmissionselektronenmikroskopische Darstellung von Pestiviren.....	15
Abb. 3: Genomaufbau und Lokalisation der Pestivirusproteine im Virusmodell.....	16
Abb. 4: Vorgeschlagene Wege der Morphogenese für Mitglieder der Familie Flaviviridae.	21
Abb. 5: „Landkarte“ des sekretorischen und endozytotischen Weges der Zelle.....	22
Abb. 6: Mögliche Wege im Trans-Golgi-Netzwerk.....	23
Abb. 7: Übersicht zu Kryoverfahren zur Einbettung von Geweben und Zellen in der Elektronenmikroskopie (EM).....	27
Abb. 8: Extrazelluläre Pestivirionen nach Epoxidharz- (a) und Gefriereinbettung (b).....	57
Abb. 9: Pestivirusinduzierter zpE auf MDBK-Zellen.....	60
Abb. 10: Wachstumskurven nach Infektion von MDBK Zellen.....	63
Abb. 11: Wachstumskurven nach Transfektion von MDBK Zellen.....	63
Abb. 12: Prinzip der FRET Signalentstehung.....	64
Abb. 13: Validierung zur relativen Quantifizierung.....	67
Abb. 14: Grafische Darstellung der relativen Quantifizierung nach real time PCR.....	69
Abb. 15: Verschiedene Präparationsmethoden von Monolayerzellen aus einer Kulturschale.	71
Abb. 16: Nachweis von VPs in mit BVDV-2 „890“ infizierten MDBK Zellen.....	76
Abb. 17: Nachweis von VPs in mit dem Pestivirus „Giraffe-1“ infizierten MDBK Zellen.....	78
Abb. 18: Mögliche VPs in multivesikulären Körperchen (MVK) in mit dem Pestivirus „Giraffe-1“ infizierten MDBK Zellen.....	81
Abb. 19: Darstellung und Immunmarkierung von extrazellulären VPs an mit dem Pestivirus „Giraffe-1“ infizierten MDBK Zellen 15 h p. i.....	85
Abb. 20: Immunogoldmarkierung des E2-Proteins an SF-21 Zellen 72 h nach Infektion mit rekombinantem Baculovirus „AcNPV-890/E2“.....	87
Abb. 21: Nachweis von E2 im Tet-on Expressionssystem 24 h p. ind. in IIFT und IEM (LR Gold).....	89
Abb. 22: Nachweis des Nukleoproteins von Tollwutvirusstamm „CVS“ in IIFT und IEM an Kryodünnschnitten.....	93
Abb. 23: Nachweis von E2 im Tet-on System in der IEM an Kryodünnschnitten.....	94
Abb. 24: Darstellung von Pestivirionen in Gefrierschnitten nach TOKUYASU.....	98
Abb. 25: Nachweis des Kapsidproteins in der IEM an Kryodünnschnitten.....	102
Abb. 26: Kolokalisation des Kapsidproteins mit ER-Marker PDI.....	102
Abb. 27: Nachweis des Strukturproteins E ^{ms} in der IEM an Kryodünnschnitten.....	103
Abb. 28: Nachweis des Strukturproteins E1 in der IEM an Kryodünnschnitten.....	103
Abb. 29: Nachweis des E2 Strukturproteins in der IEM an Kryodünnschnitten.....	104
Abb. 30: Kolokalisation des Strukturproteins E2 mit ER-Marker PDI.....	105
Abb. 31: Nachweis von Doppelstrang RNS in der IEM an Kryodünnschnitten.....	106
Abb. 32: Darstellung von Membranen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) nach unterschiedlichen Einbettungen.....	108
Abb. 33: Zugänglichkeit viraler Antigene im Kryoschnitt und Darstellung der Virionen im EM.....	110
Abb. 34: Schematische Darstellung des Erwartungswertes für Virionen (VP) in Dünnschnitten.....	112
Abb. 35: Derzeit gültiges Modell zur Pestivirusmorphogenese, illustriert mit Bildern aus der vorliegenden Arbeit.....	116
Abb. 36: Einbindung des endosomalen Kompartiments in intrazelluläre Transportwege.....	121

III. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Virusfamilie <i>Flaviviridae</i>	11
Tab. 2: Auflistung der verwendeten Primär-Antikörper.	30
Tab. 3: Master-Mixe für die Reverse Transkription und für die real time PCR.	46
Tab. 4: Für Infektions-, Morphologie- und Immunhistologiestudien ausgewählte Pestiviren.	59
Tab. 5: Ergebnisse der real time PCR Validierung für die relative Quantifizierung.	68
Tab. 6: Zusammenfassung der Untersuchungen zur Infektionskinetik.....	70
Tab. 7: Legende für verwendete Abkürzungen bei der Beschriftung von EM Bildern.	74
Tab. 8: Ergebnisübersicht der EM-Untersuchungen zur Darstellung von Pestiviruspartikeln.	83
Tab. 9: Verwendete Expressionssysteme.	86
Tab. 10: Pestivirus-Infektionsmodelle für die Immunultrahistologie (TOKUYASU-Technik).	95
Tab. 11: Übersicht zum getesteten Reaktionsspektrum der verfügbaren Antikörper im IIFT.	96
Tab. 12: Infektion mit Pestiviren: Ergebnisse der IEM an Gefrierdünnschnitten von mit Pestiviren infizierten Zellen.	101
Tab. 13: Übersicht zum Reaktionsspektrum der in der IEM eingesetzten Antikörper.	106

IV. Abkürzungsverzeichnis

AcNPV	„Autographa californica nuclear polyhedrosis Virus“
Ak	Antikörper
AS	Aminosäure
BDV	Border Disease Virus
BFAV	Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere
BHK-21	„Baby Hamster Kidney“ (Hamster-Nieren-Zelllinie)
Bp	Basenpaare
BrAk	Brücken-Antikörper
BVDV-1	Virus der Bovinen Virus Diarrhöe 1
BVDV-2	Virus der Bovinen Virus Diarrhöe 2
bzw.	beziehungsweise
C	„Core“, Kapsidprotein
ca.	circa
CCM	„cell culture medium“
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
COP	„Coatomer Proteins“
C _T	„Threshold Cycle“
Cy3	Cyanin 3 (Fluoreszenzfarbstoff)
d. h.	das heißt
dd	doppelt destilliert (Aqua dd)
DMEM	„Dulbecco`s Modified Eagle Medium“
DNS (DNA)	Desoxyribonukleinsäure
ds	Doppelstrang
E	a) „envelope“, Pestivirushüllprotein b) Effizienz (bzgl. real time PCR)
EM	Elektronenmikroskop, Elektronenmikroskopie
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	„Endoplasmatic Reticulum Golgi Intermediate Compartment“
F	Farad
FKS	Fötales Kälberserum
FRET	„Fluorescence Resonance Energy Transfer“
FSMEV	Frühsommermeningoenzephalitis-Virus

Abkürzungsverzeichnis

g	a) Gramm b) "gravity", Erdbeschleunigung
GA	Glutardialdehyd
GBV-A/ -B/ -C	GB Virus -A/ -B/ -C (GB= Patienteninitialien)
h	„heure“ (Stunde)
HA	Hämagglutinin
HCV	Hepatitis C Virus
ICTV	International Committee for Taxonomy of Viruses
IgG	Immunglobulin G/ Gammaglobulin
IIFT	indirekter Immunfluoreszenztest
ILV	intraluminales Vesikel
inf.	infizierte
IRES	Internal ribosomal entry site
JIV	„J-domain protein interacting with viral protein“
Kan.	Kaninchen
kB	Kilobasen
KSPV	Virus der Klassischen Schweinepest
l	Liter
log	negativer dekadischer Logarithmus
m	a) milli b) Steigung der Standardkurve
M	Mol, molar
m. o. i.	„multiplicity of infection“
mAk	monoklonaler Antikörper
MD	Mucosal Disease
MDBK	„Madin Darby Bovine Kidney“ (Rindernierenzellen)
min	Minute
MLKs	Multilamilläre Körperchen „multilamellar bodies“
MVKs	Multivesikuläre Körperchen „multivesicular bodies“
nm	Nanometer
NTR	nicht translatierte Region
nzp	nicht zytopathogen
Ø	Durchmesser
OD	„optical density“
ORF	„open reading frame“, offener Leserahmen

OsO ₄	Osmiumtetroxid
p. i.	„post infectionem“ (nach der Infektion)
p. ind.	post inductionem (nach der Induktion)
p. t.	post transfectionem (nach der Transfektion)
PAG	Protein A Gold
pAk	polyklonaler Antikörper
PBS def.	“Phosphate buffered saline deficient”
PCR	Polymerase-Kettenreaktion „Polymerase Chain Reaction“
PDI	Protein Disulfid Isomerase
PFA	Paraformaldehyd
PFU	„plaque forming units“
pH	„pondus/ potentia hydrogenii“, negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität
PI	persistent infiziert
PK-15	„Porcine Kidney–15“ (Schweinenierenzellen)
PKR	Proteinkinase R
q	quantitative
rER	raues Endoplasmatisches Retikulum
RNS	Ribonukleinsäure
RQ	relative Quantifizierung
RT	a) Reverse Transkription b) Raumtemperatur
rtTA	reverser tetrazyklin-kontrollierter Transaktivator
RT-PCR	Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion
s	Sekunde
s. o.	siehe oben
SF-21	„Spodoptera frugiperda“ (Schmetterling-Ovarial-Zelllinie)
SK-6	„Swine Kidney–6“ (Schweinenieren-Zelllinie)
TCID ₅₀	„50% Tissue Culture Infectious Dosis“
TGN	“Trans Golgi Network”
u. U.	unter Umständen
U	a) Unit b) Umdrehungen
UV	ultraviolett
V	Volt
VLP	“virus like particle”

Abkürzungsverzeichnis

Vol	Volumenäquivalent
VP	Viruspartikel
VTC	„vesicular tubular clusters“
zp	zytopathogen
zpE	zytopathischer Effekt
α	anti
Δ	delta
λ	lambda
μ	mikro
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius

1 Einleitung

1.1 Taxonomie von Pestiviren

Pestiviren werden aufgrund ihrer Morphologie, Genomorganisation und Strategie der Genexpression nach der derzeit gültigen Nomenklatur des ICTV („International Committee for Taxonomy of Viruses“) zur Virusfamilie der *Flaviviridae* gezählt. Diese Familie umfasst zurzeit drei Genera: *Flavivirus*, *Pestivirus* und *Hepacivirus*. Zusätzlich zu den drei Genera gibt es Gruppen von Viren (GB-Virus A und GB-Virus C), die innerhalb der Familie noch nicht klassifiziert sind (Thiel *et al.*, 2005). Eine Auflistung von (ausgewählten) Virusspezies aus den Genera ist in Tab. 1 dargestellt.

Tab. 1: Virusfamilie *Flaviviridae*.

Genus	(ausgewählte) Spezies
<i>Pestivirus</i>	Klassisches Schweinepest Virus (KSPV) Bovines Virus Diarrhöe Virus 1 (BVDV-1) Bovines Virus Diarrhöe Virus 2 (BVDV-2) Border Disease Virus (BDV) „vorläufige“ Spezies: „Giraffe-1“ Isolate ohne Spezieszuordnung: z. B. „HoBi“, „Antilope“, „Bungowannah Virus“
<i>Flavivirus</i>	Dengue-Virus Frühsommermeningoenzephalitis-Virus (FSMEV) Gelbfieber-Virus Japanische-Enzephalitis-Virus Louping-III-Virus Wesselsbron-Virus West-Nil-Virus
<i>Hepacivirus</i>	Hepatitis C Virus (HCV) GB Virus B (GBV-B)
nicht klassifiziert	GB Virus A und C (GBV-A und GBV-C)

Das Genus *Pestivirus* umfasst mit dem Virus der Klassischen Schweinepest (KSPV), dem Virus der Bovinen Virus Diarrhöe (Typ 1 und 2) und dem Border Disease Virus (BDV) veterinärmedizinisch bedeutsame Virusspezies. Einige Pestiviren können auf der Basis phylogenetischer Analysen nicht den oben genannten Spezies zugeordnet werden; dies weist auf eine erhebliche Diversität innerhalb des Genus hin. Ein Isolat aus einer Giraffe (Bezeichnung: „H38“ oder „Giraffe-1“), das vor über 30 Jahren isoliert wurde, ist von der ICTV als mögliche fünfte Spezies eingestuft worden (Thiel *et al.*, 2005). Weitere Pestiviren, die bislang keiner der bestehenden Spezies zugeordnet wurden, sind die Isolate „Antilope“

(Vilcek et al., 2001; Cedillo-Rosales, 2004), „Bungowannah virus“ (Kirkland et al., 2007) und „HoBi“. Mittlerweile wurden weitere Isolate mit enger Verwandtschaft zu „HoBi“ beschrieben; daher wird diese Gruppe unter „HoBi-like“ Isolaten zusammengefasst (Schirrmeyer et al., 2002; Stahl et al., 2009). Abb. 1 zeigt eine grafische Darstellung der Heterogenität von Pestiviren in Form eines phylogenetischen Baumes auf Basis des N^{pro} Gens.

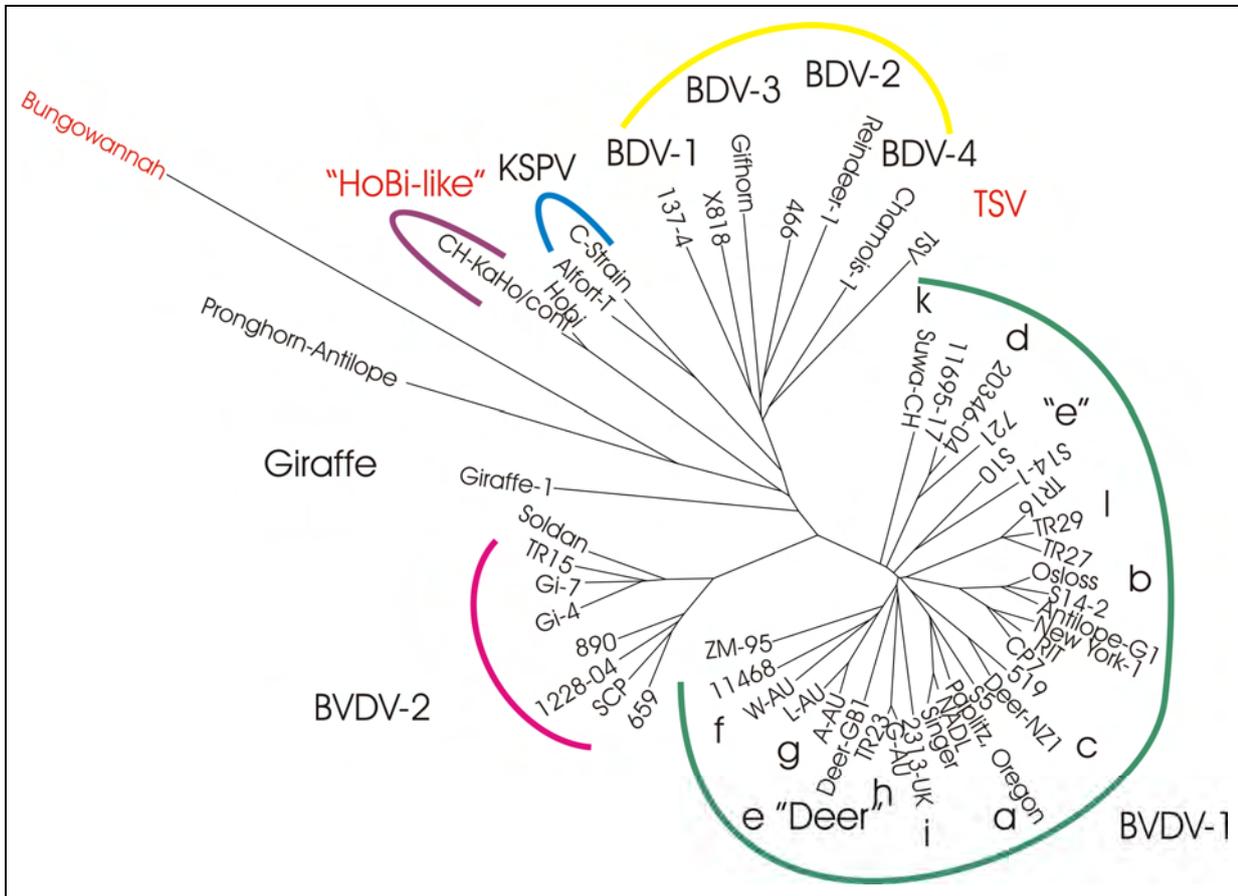


Abb. 1: Genetische Verwandtschaft von Pestiviren.
Phylogenetischer Baum auf Basis des N^{pro} Gens mit Vertretern des Genus *Pestivirus* einschließlich der Isolate ohne Spezieszugehörigkeit (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von C. Förster, Giessen).

1.2 Wirtsspektrum, Pathogenese und Klinik

Pestiviren infizieren ausschließlich Paarhufer. KSPV konnte bislang unter natürlichen Bedingungen nur aus Haus-, Wildschweinen und Pekaries (Nabelschweinen; Vargas Teran et al., 2004) isoliert werden. Im Gegensatz dazu ist die Wirtsspezifität der ruminanten Pestiviren BVDV-1, BVDV-2 und BDV weniger stark ausgeprägt.

So wurden BVD-Viren unter natürlichen Bedingungen außer vom Rind auch aus Schaf, Ziege, Schwein und Wildwiederkäuerarten isoliert (Becher et al., 1997; 1999; Nettleton, 1990). Nach meist oronasaler Übertragung repliziert das Virus primär in den Schleimhäuten der Eintrittspforte und induziert in der Folge eine Immunsuppression in Verbindung mit

Leukopenie und Infektion von lymphatischem Gewebe. Im Hinblick auf klinische Ausprägung können unterschiedliche Bilder bei den verschiedenen Virusspezies beobachtet werden.

1.2.1 Bovines Virus Diarrhöe Virus 1 und 2 (BVDV-1 und -2)

Die Infektion von immunkompetenten adulten Rindern mit BVDV verläuft meist subklinisch oder unter milden Erkrankungserscheinungen mit einer kurzen Virämie (*Pritchard, 1963; Baker, 1987*). Die Klinik ist geprägt von Diarrhöe, Fieber, Depression, Anorexie, vermehrtem Sekretausfluss aus Nase und Augen, Schleimhautveränderungen am Flotzmaul sowie Fruchtbarkeitsstörungen und respiratorischen Symptomen (*Potgieter et al., 1985; Baker, 1987*). Durch die Entwicklung einer spezifischen Immunantwort wird die Infektion in der Regel aber rasch eliminiert. Eine Sonderform stellt die Infektion mit hoch virulenten BVDV-Stämmen dar, wobei respiratorische Symptome und ein hämorrhagisches Syndrom mit Blutungen der Schleimhäute, blutigem Durchfall und Thrombozytopenie auftreten können, die oft zum Tod der Tiere führen (*Rebhun et al., 1989; Corapi et al., 1990b; Pellerin et al., 1994*).

Bei trächtigen Tieren kann es zu einer diaplastaren Infektion der Frucht kommen, die abhängig vom Zeitpunkt der Infektion während der Trächtigkeit in Abort, Totgeburt, Missbildungen oder der Geburt lebensschwacher Kälber resultieren kann (*Casaro et al., 1971; Kahrs et al., 1973; Baker, 1987*). Durch eine Infektion mit nicht zytopathogenen (nzp, siehe Kap. 1.5) BVD Viren im ersten Trimester der Trächtigkeit (Tage 40 - 125) kann es zur Geburt persistent infizierter (PI) Kälber kommen, die lebenslang kontinuierlich Virus ausscheiden. PI-Tiere bleiben häufig im Wachstum zurück, können aber auch klinisch unauffällig sein (*Coria und Mc Clurkin, 1978*). „Mucosal Disease“ (MD) ist eine besonders schwere Verlaufsform der BVD und tritt ausschließlich bei PI-Tieren meist im Alter von 6 bis 24 Monaten auf.

Die MD Erkrankung geht mit Fieber, Anorexie, schweren Ulzerationen und Nekrosen der Schleimhäute sowie der lymphatischen Organe des Verdauungstrakts einher und führt über unstillbare, oft blutige Durchfälle nach wenigen Tagen zum Tod (*Brownlie et al., 1984*). Interessanterweise lässt sich aus einem an MD erkrankten Tier immer ein nzp BVDV und ein zytopathogenes (zp) BVDV isolieren, die antigenetisch eng miteinander verwandt sind und daher als Paar bezeichnet werden. Hieraus wurde die Hypothese abgeleitet, dass entweder eine Mutation des nzp Biotyps im PI-Tier (*Corapi et al., 1988; Howard, 1990; Meyers und Thiel, 1996*) oder eine Superinfektion mit einem zp Isolat zu dem parallelen Nachweis beider

Biotypen führt (*Brownlie et al., 1984; Fritzeimer et al., 1997; Becher et al., 1999*). In Deutschland soll die BVD Erkrankung auf der Grundlage der BVD/MD-Verordnung vom 11.12.2008, die 2011 in Kraft tritt, bekämpft und in deutschen Rinderbeständen ausgerottet werden.

1.2.2 Border Disease Virus der Schafe (BDV)

BDV verursacht bei Schafen und Ziegen zumeist subklinisch verlaufende oder mit milden Symptomen wie Diarrhöe einhergehende Infektionen, die bei adulten Tieren zur Ausbildung virusneutralisierender Antikörper führen (*Meyers und Thiel, 1996*). Ebenso wie nach Infektion mit BVDV-1 und -2 kann es zu Fruchtbarkeitsstörungen kommen. Eine diaplazentare Infektion des Fötus kann bei tragenden Tieren zum Abort, zu Missbildungen der Frucht oder zur Geburt lebensschwacher, persistent infizierter Lämmer führen („Hairy shaker“ Syndrom) (*Nettleton, 1990; Terpstra, 1981*). In Analogie zu Infektionen mit BVDV beim Rind wurde ein MD-ähnliches Krankheitssyndrom beobachtet, das offenbar nur selten vorkommt (*Nettleton et al., 1992*).

1.2.3 Klassisches Schweinepest Virus (KSPV)

Infektionen mit KSPV können bei Schweinen abhängig von der Virulenz des entsprechenden Stamms mit hoher oder niedriger Morbidität und Letalität einhergehen. Es werden akute und chronische Verläufe beobachtet. Dabei treten Fieber, Anorexie, Diarrhöe und zentralnervöse Störungen auf. In einigen Fällen zeigen sich typische Hämorrhagien in Haut, Schleimhäuten und inneren Organen. Auch sind Fruchtbarkeitsstörungen, diaplazentare Infektionen und die Geburt persistent infizierter Tiere von erheblicher Bedeutung. Es ist anzunehmen, dass durch staatliche Bekämpfungsmaßnahmen KSPV Stämme von hoher Virulenz selektiv zurückgedrängt wurden. Entsprechend führen KSPV Stämme, die bei neueren Ausbrüchen in Europa isoliert wurden, in den meisten Fällen eher zu Erkrankungsformen mit weniger charakteristischen Symptomen (*Floegel-Niesmann et al., 2003*).

Die Erkrankung unterliegt in Deutschland der Anzeigepflicht und wird EU-weit auf der Grundlage der Richtlinie des Rates 2001/89/EC und Entscheidung der Kommission 2002/106/EC einheitlich bekämpft.

1.3 Virusaufbau und Genomorganisation

Pestiviren sind behüllt mit einem Durchmesser von 40-60 nm und einem elektronendichten inneren Kapsid (\emptyset ca. 30 nm) (*Meyers und Thiel, 1996*) (siehe Abb. 2). Die genauere

Charakterisierung von Virionen erweist sich bisher als schwierig. Eine Reinigung wird durch vergleichsweise niedrige Viruskonzentrationen nach Anzucht in Zellkultur und durch die Sedimentationseigenschaften (Dichte in Sucrosegradienten: 1,13 g/ml, in Iodixanol: 1,09 g/ml), die keine klare Trennung von zellulären Membranen erlauben, erschwert (Laude, 1979; Maurer et al., 2004).

Die Darstellung und Immunmarkierung von Viruspartikeln in Suspension konnten u. a. bei Verwendung von Kalium-Natrium-Tartrat erreicht werden (Dichte von KSPV: 1,18g/ml) (Unger, 1993).

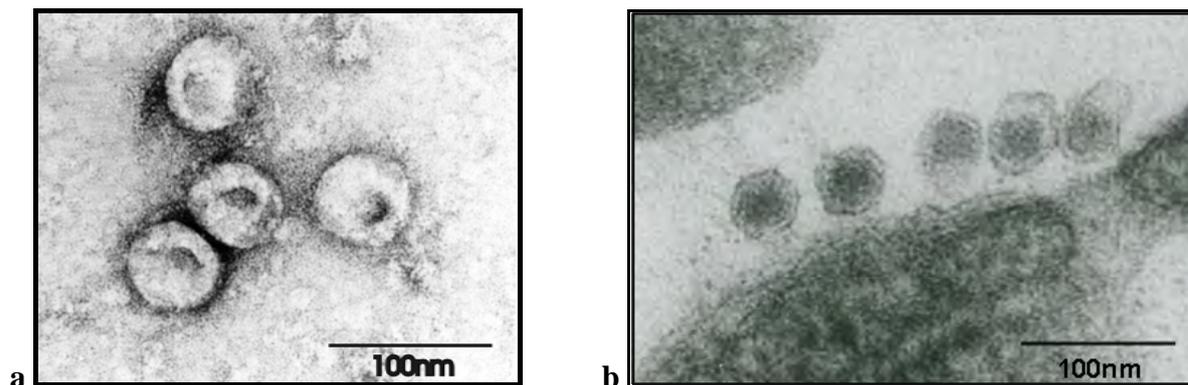


Abb. 2: Transmissionselektronenmikroskopische Darstellung von Pestiviren.

a) Pestiviruspartikel (BVDV-1, Virussuspension nach Gradientenzentrifugation) im Negativkontrastverfahren (Foto mit freundlicher Genehmigung von M. König, Giessen). **b)** Dünnschnitt infizierter MDBK Zellen mit extrazellulären Pestiviruspartikeln („Giraffe-1“) (Foto aus der vorliegenden Arbeit).

Virionen sind über einen relativ breiten pH Bereich stabil, lassen sich aber durch organische Lösungsmittel, Detergenzien und Hitze (Temperaturen über 40 °C) inaktivieren (Thiel et al., 2005). Das Genom besteht aus einer einzelsträngigen Ribonukleinsäure (RNS) mit positiver Polarität, ist ca 12,3 Kilobasen (kB) groß und enthält einen offenen Leserahmen („open reading frame“, ORF), der von nicht translatierten Regionen (5'NTR mit ca. 380 Nukleotiden und 3'NTR mit ca. 200 Nukleotiden) flankiert wird (Collett et al., 1988a; Brock et al., 1992; Avalos Ramirez et al., 2001). Die NTR-Bereiche enthalten wichtige Signale für die Replikation des Virusgenoms und die Synthese der Virusproteine.

1.4 Translation und Funktionen der viralen Proteine

Der ORF kodiert für ein Polyprotein von 4000 AS (Aminosäuren). Die Translation wird durch eine Signalsequenz (IRES, „internal ribosomal entry site“) in der 5'NTR initiiert (Rijnbrand et al., 1997; Chon et al., 1998; Di Marco et al., 2005).

Somit lässt sich die Translationsinitiation der Pestiviren, aber auch die der Hepaciviren von der durch eine 5'-Cap-Struktur initiierten Translation der Flaviviren abgrenzen (Tsukiyama-

Kohara *et al.*, 1992; Poole *et al.*, 1995). Das Polyprotein wird während und nach der Translation durch virale und zelluläre Enzyme in vier Strukturproteine C (Core, Kapsid), E^{rns} (E= „envelope“, rns = „RNase secreted“), E1 und E2 sowie acht Nicht-Strukturproteine (NS) N^{Pro}, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B gespalten (Purchio *et al.*, 1984; Miller, R. H. und Purcell, 1990) (siehe Abb. 3).

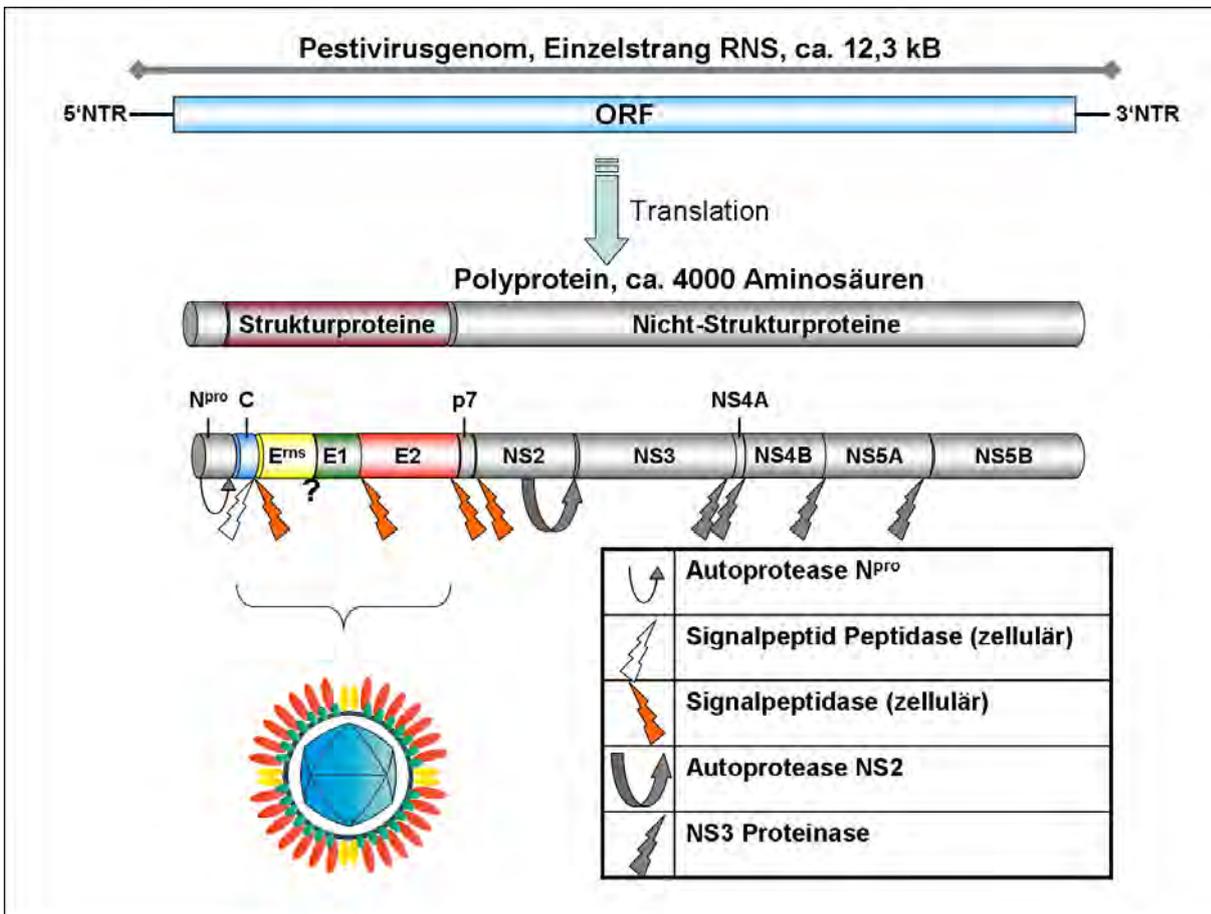


Abb. 3: Genomaufbau und Lokalisation der Pestivirusproteine im Virusmodell.
NTR = nicht translatierte Region, ORF = „open reading frame“, offener Leserahmen.

Die N-terminale Protease N^{Pro} ist das erste Protein, das im ORF kodiert wird. Es erzeugt durch seine autokatalytische Abspaltung den N-Terminus des im Polyprotein folgenden Kapsidproteins C (Wiskerchen *et al.*, 1991; Stark *et al.*, 1993).

Das Kapsidprotein und die Glykoproteine der Virushülle E^{rns}, E1 und E2 sind die Strukturproteine des Virions (Thiel *et al.*, 1991; Weiland, F. *et al.*, 1999). Das aus etwa 90 AS bestehende Kapsidprotein wird durch die zelluläre Signalpeptidase von E^{rns} abgespalten und durch weitere Prozessierung seines C-Terminus durch eine ER-ständige Signalpeptid Peptidase entsteht das reife Kapsidprotein (Heimann *et al.*, 2006). Der Anteil an basischen Aminosäuren im Kapsidprotein ermöglicht vermutlich die Bindung von RNS und es wird postuliert, dass diese Eigenschaft zudem eine wichtige Rolle bei der Viruskapsidbildung spielt

(Murray *et al.*, 2008b). E^{ms}, E1, E2 und p7 werden ebenfalls durch Signalpeptidasen freigesetzt, wobei für die Spaltung zwischen E^{ms} und E1 eine noch unbekannt zelluläre Protease postuliert wird (Rümenapf *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 1994; Elbers *et al.*, 1996; Harada *et al.*, 2000).

Das E^{ms}-Protein ist Bestandteil des Pestivirions und bildet über Disulfid-Brücken Homodimere aus. Die Membranbindung wird durch einen C-terminal gelegenen ungewöhnlichen Membrananker erreicht (Fetzer *et al.*, 2005; Tews und Meyers, 2007). E^{ms} besitzt darüber hinaus eine intrinsische RNase-Aktivität und kann in freier Form auch extrazellulär nachgewiesen werden (Rümenapf *et al.*, 1991; Thiel *et al.*, 1991; Rümenapf *et al.*, 1993). Es wurde gezeigt, dass es im Überstand von infizierten Zellen Doppelstrang (ds) RNS bindet und bei niedrigem pH diese über seine RNase Aktivität abbaut (Iqbal *et al.*, 2004; Magkouras *et al.*, 2008). Darüber hinaus ist es in der Lage zelluläre Membranen zu passieren (Langedijk, 2002). Daher wird vermutet, dass E^{ms} auch intrazellulär dsRNS bindet, diese im endosomalen Kompartiment abbaut und so die angeborene Immunantwort (Bildung von alpha- und beta-Interferon) unterdrücken kann.

In E1 und E2 konnten C-terminale hydrophobe Sequenzen identifiziert werden, die für die Membranverankerung dieser Proteine verantwortlich sind (Van Zijl *et al.*, 1991; Rümenapf *et al.*, 1993). Auch diese Strukturproteine sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden; in infizierten Zellen und in Virionen können E1/E2-Heterodimere und E2-Homodimere vorliegen (Weiland, E. *et al.*, 1990; Thiel *et al.*, 1991). E2 ist bei Pestiviren für die Bindung der Virionen an den zellulären Rezeptor CD46 verantwortlich (Maurer *et al.*, 2004). Im infizierten Tier werden Antikörper gegen E^{ms} und E2 gebildet (Weiland, E. *et al.*, 1990; 1992), die eine schützende Immunität vermitteln (Rümenapf *et al.*, 1991; König *et al.*, 1995).

Der 3' terminale Bereich des ORF kodiert für Nicht-Strukturproteine. Von einigen dieser Proteine sind Funktionen bekannt: NS2 z. B. besitzt Autoproteaseaktivität, durch die eine Spaltung von NS2-3 erfolgt (Lackner *et al.*, 2004); freies NS3 besitzt NTPase-, Helikase und Serinprotease-Aktivität und ist essentiell für die virale Replikation. Daneben ist NS3 auch für die Freisetzung der nachfolgenden Nicht-Strukturproteine verantwortlich (Collett *et al.*, 1991; Meyers und Thiel, 1996; Tautz *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1997). Die unprozessierte Form von NS2-3 wird offensichtlich für die Bildung neuer Viruspartikel benötigt (Agapov *et al.*, 2004). NS4A ist ein Kofaktor für die NS3 Protease (Tautz *et al.*, 1997). Die Nicht-Strukturproteine NS3-NS5B bilden den Replikationskomplex (Tautz *et al.*, 1994; Behrens *et al.*, 1998), wobei NS5B die Funktion einer RNS-abhängigen RNS-Polymerase zukommt (Zhong, W. *et al.*, 1998; Kao *et al.*, 1999; Steffens *et al.*, 1999).

1.5 Biotypen

Anhand ihrer Eigenschaft, in empfänglichen Gewebekulturzellen einen zytopathischen Effekt (zpE) hervorzurufen, wird bei Pestiviren ein zytopathogener (zp) Biotyp von einem nicht zytopathogenen (nzp) Biotyp unterschieden. Der zpE ist gekennzeichnet durch Apoptose der Zellen, die mit Vakuolisierung des Zytoplasmas und Kernpyknose einhergeht (*Gillespie et al., 1960a; 1960b; Zhang et al., 1996; Hoff und Donis, 1997; Grummer et al., 1998; Birk et al., 2008*). Zytopathogene Biotypen zeichnen sich durch eine erhöhte Expression von freiem NS3 und vermehrte RNS-Replikation aus (*Meyers und Thiel, 1996; Lackner et al., 2004*). Die Kaskade zur Einleitung der Apoptose bei Pestivirusinfektion ist bis jetzt nicht vollständig geklärt. Es ist möglich, dass ER-Stress-Signale eine Rolle spielen (*Jordan et al., 2002b*), die durch eine übermäßige Beanspruchung von ER-Membranen bei der Bildung von Replikationskomplexen entstehen könnten (*Rümenapf und Thiel, 2008*).

1.6 Replikation und Virusmorphogenese

Die Replikation des viralen Genoms findet in Assoziation mit intrazellulären Membranen statt. Es werden sowohl die Nicht-Strukturproteine NS3 bis NS5B als auch zelluläre Komponenten benötigt. Pestivirus RNS wird bereits 4-6 h nach der Infektion nachgewiesen (*Gong et al., 1996; 1998*).

Obwohl die Strukturproteine von Pestiviren seit einigen Jahren bekannt sind, blieben die einzelnen Schritte bei der Synthese neuer Virionen sowie deren genauer Aufbau, Struktur und Stöchiometrie bisher weitgehend unbekannt. Es wird vermutet, dass sich die Strukturproteine der Virushülle an den Membranen des rauen endoplasmatischen Retikulums (rER) anreichern. Weiterhin wird angenommen, dass die Virionen in Form von Knospung ("Budding") an intrazellulären Membranen insbesondere des rER entstehen, wobei das Genom und das Kapsid in die Hülle eingeschlossen werden (*Grummer et al., 2001*). Die Nicht-Strukturproteine NS2-3 und NS5B spielen ebenfalls eine Rolle bei der Virionenentstehung und Ausschleusung (*Agapov et al., 2004; Ansari et al., 2004*). Virionen werden wahrscheinlich über den exozytotischen Weg aus der Zelle ausgeschleust. Ein „Budding“ an der Zellmembran gilt als unwahrscheinlich, da die Hüllproteine dort nicht nachgewiesen werden konnten (*Greiser-Wilke et al., 1991; Weiland, F. et al., 1999*).

Es wird angenommen, dass das rER und die dort lokalisierten Enzyme einen entscheidenden Einfluss auf die Faltung der viralen Strukturproteine und somit die Virussynthese haben (*Branza-Nichita et al., 2001; Durantel et al., 2004*). Eine Golgi-assoziierte Prozessierung

konnte durch Resistenz von virionassoziiertem E2-Protein gegenüber Endoglukosidase H (Jordan *et al.*, 2002a) sowie durch das Ausbleiben von Virussekretion nach Brefeldin A Behandlung, die den sekretorischen Weg im Bereich des ER und cis-Golgi Bereiches zusammenbrechen lässt, gezeigt werden (Macovei *et al.*, 2006).

1.7 Replikationsort und Morphogenese von Flaviviren

Innerhalb der Virusfamilie *Flaviviridae* ist die Replikation und Morphogenese von Vertretern des Genus *Flavivirus* - insbesondere im Bereich der Ultrahistologie - zur Zeit am besten untersucht. Im Folgenden wird der Begriff „Flaviviren“ ausschließlich zur Bezeichnung von Vertretern des Genus *Flavivirus* verwendet. Die Replikation von Flaviviren findet in enger Assoziation mit virusinduzierten intrazellulären Membranalterationen statt, die um die Replikationskomplexe herum entstehen und aufgrund ihrer unterschiedlichen Morphologie als „Membranenkonvolute“, „parakristalline Strukturen“ und „Vesikelpakete“ bezeichnet werden. In den veränderten Bereichen konnten mittels Immunelektronenmikroskopie virale Struktur- und Nicht-Strukturproteine sowie dsRNS nachgewiesen werden (Westaway *et al.*, 1997a; 1997b; Mackenzie und Westaway, 2001; Mackenzie, 2005; Miller, S. *et al.*, 2007). Darüber hinaus gelang der morphologische Nachweis von Viruspartikeln im Lumen des ER in unmittelbarer Nähe zu den veränderten Membranen sowie im Golgi-Komplex (Westaway *et al.*, 1997b; Mackenzie und Westaway, 2001). In einer aktuellen Studie wurde zum ersten Mal die intrazelluläre Lokalisation von Virionen des Dengue Fieber Virus über Elektronentomografie dargestellt (Welsch *et al.*, 2009). Durch die Tomografie (dreidimensionale Auswertung von Dünnschnitten) konnte gezeigt werden, dass die durch die Virusinfektion alterierten Membranen Teil eines vom ER stammenden Netzwerkes sind. Weiterhin wurden in Membranvesikeln Poren entdeckt, durch die synthetisierte RNS nach Replikation freigesetzt werden könnte. In unmittelbarer Nähe dazu konnten Virionen bei der Abschnürung an ER Membranen beobachtet werden. Somit steht der Prozess der Virionenentstehung für Flaviviren kurz vor seiner Aufklärung. Synthetisierte Virionen werden über den sekretorischen Weg der Zelle transportiert; der Transport beinhaltet bei Flaviviren die Reifung der E und M Proteine im Golgi-Komplex (Murray *et al.*, 2008a). Die Freisetzung reifer Partikel soll über Exozytose stattfinden, konnte allerdings bisher ultrahistologisch nicht dargestellt werden.

1.8 Replikationsort und Morphogenese von Hepaciviren

Die herkömmliche Anzucht von HCV in Zellkultur ist nicht möglich; dies beeinträchtigte lange Untersuchungen zur Vermehrung von HCV. Mittlerweile stehen verschiedene in-vitro Modelle zur Verfügung, die über Expression viraler Proteine oder über den Einsatz von Replikons eine natürliche Infektion simulieren und erste Einsichten in den Replikations- und Morphogeneseprozess von Hepaciviren erlauben (*Moradpour et al., 2007; Lindenbach et al., 2005; Wakita et al., 2005; Zhong, J. et al., 2005*).

Es wurde gezeigt, dass die Expression sowohl einzelner (Nicht-) Strukturproteine als auch des gesamten Polyproteins in Kulturzellen umfassende Membranveränderungen hervorruft. Durch Immunultrahistologie wurde nachgewiesen, dass die membranverändernden Proteine (*Egger et al., 2002*) sowie dsRNS (*Gosert et al., 2003*) an den alterierten Membranen lokalisiert sind, die mit dem Begriff „membranöses Netz“ als Synonym für den viralen Replikationskomplex bezeichnet werden.

Die Expression von HCV Strukturproteinen führt zur Bildung von virusähnlichen Partikeln („virus like particles“, VLPs) (Durchmesser 50 nm) in Zellkultur, die sich an ER Membranen in das Lumen abschnüren (*Blanchard et al., 2002; Vauloup-Fellous et al., 2006*). In einer anderen Studie wurden Partikel von 50-60 nm Durchmesser nach Transfektion des vollständigen HCV Genoms bei der Abschnürung an ER Membranen und in zytoplasmatischen Vesikeln gefunden. Durch Immunelektronenmikroskopie konnten E1 (Hüllprotein) und C (Kapsidprotein) an ER Membranen nachgewiesen werden (*Murakami et al., 2006*).

Nach dem momentan gültigen Modell erfolgt die Replikation von HCV im Zytoplasma an veränderten zellulären Membranen („membranöses Netz“) in enger Assoziation mit der Abschnürung neuer Virionen an vom ER stammenden Membranen. Die Ausschleusung findet über den sekretorischen Weg der Zelle statt (*Moradpour et al., 2007*), wobei eine mögliche Verbindung zwischen dem Lipoprotein-Metabolismus der Zelle und der Virusmorphogenese postuliert wird (*Popescu und Dubuisson, 2010*).

Abb. 4 zeigt vereinfacht im direkten Vergleich die momentan gültigen Modelle für die Virusmorphogenese und -freisetzung der drei Genera aus der Familie *Flaviviridae* (*Murray et al., 2008a*).

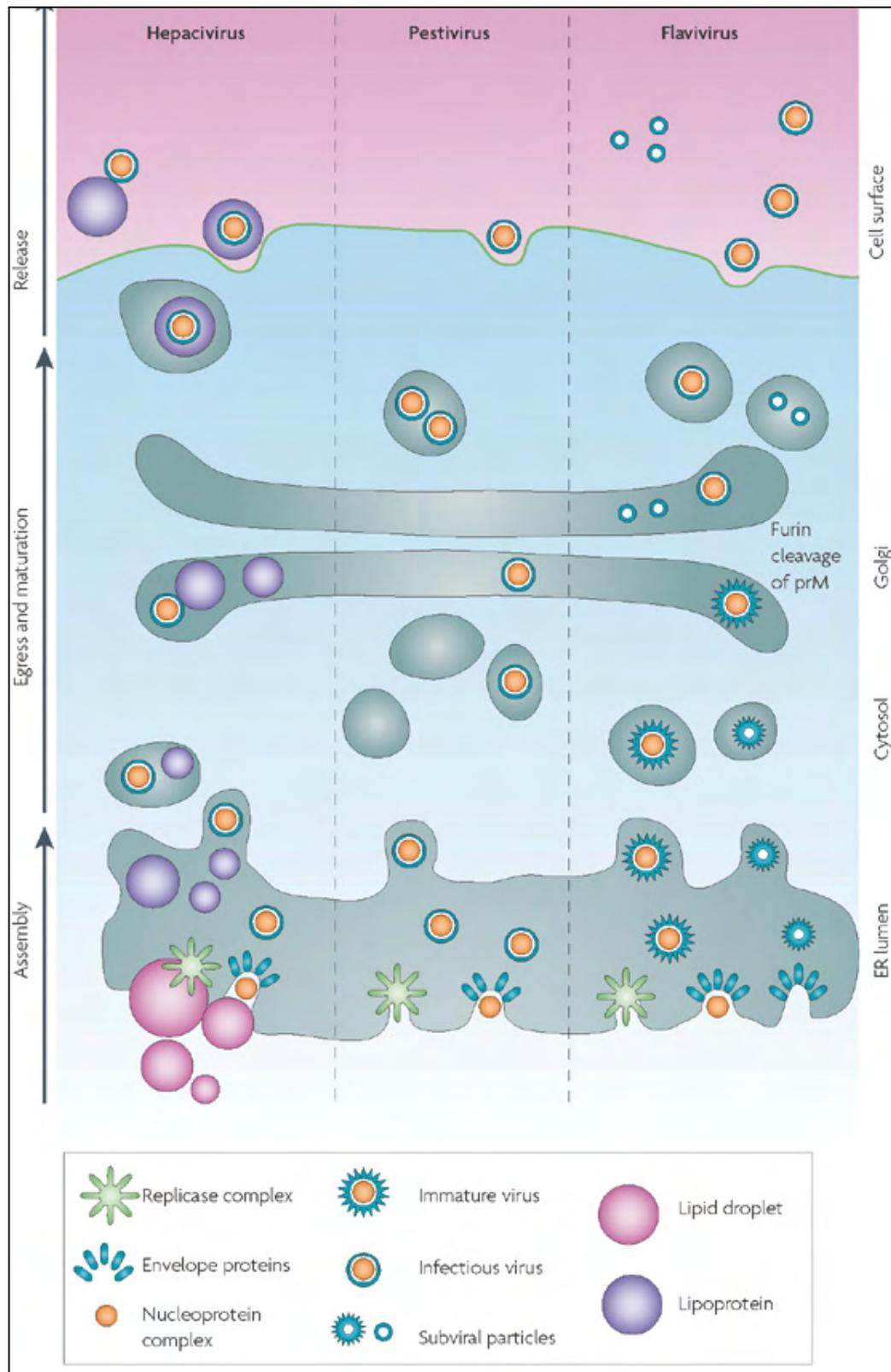


Abb. 4: Vorgeschlagnene Wege der Morphogenese für Mitglieder der Familie Flaviviridae.
 Aus Murray et al., 2008a; mit freundlicher Genehmigung der Nature Publishing Group (NPG).

1.9 Der sekretorische Weg der Zelle

Nach aktuellem Wissensstand wird angenommen, dass der intrazelluläre Transport von Pestivirionen über den sekretorischen Weg der Zelle und die Freisetzung über Exozytose stattfinden (Lindenbach und Rice, 2001; Thiel et al., 2005; Murray et al., 2008a; Rümenapf und Thiel, 2008). An dieser Stelle wird daher der momentane Kenntnisstand zum sekretorischen Weg der Zelle kurz zusammengefasst.

Innerhalb der Zelle stehen alle beteiligten Kompartimente untereinander und mit der Zellmembran über Transportvesikel in Verbindung. Abb. 5 zeigt eine Übersicht über die Verknüpfung des sekretorischen und des endozytotischen Weges. Über den sekretorischen Weg (rote Pfeile) werden Proteinmoleküle vom ER zur Plasmamembran oder zu den Lysosomen transportiert, während über den endozytotischen Weg (grüne Pfeile) z. B. Proteine von Vesikeln an der Zellmembran aufgenommen werden und dann über Endosomen zu Lysosomen transportiert werden. Dabei ist die Transportrichtung eines Vesikels eindeutig festgelegt, da sich die meisten Transportvesikel an mit bestimmten Schlüsselproteinen besetzten Membranregionen („coated vesicles“) bilden. Es gibt drei gut charakterisierte Arten von Transportvesikeln: „Clathrin-coated“, „COP I (coatomer Proteins) coated“ und „COP II coated“ Vesikel, die jeweils für unterschiedliche Transportwege genutzt werden.

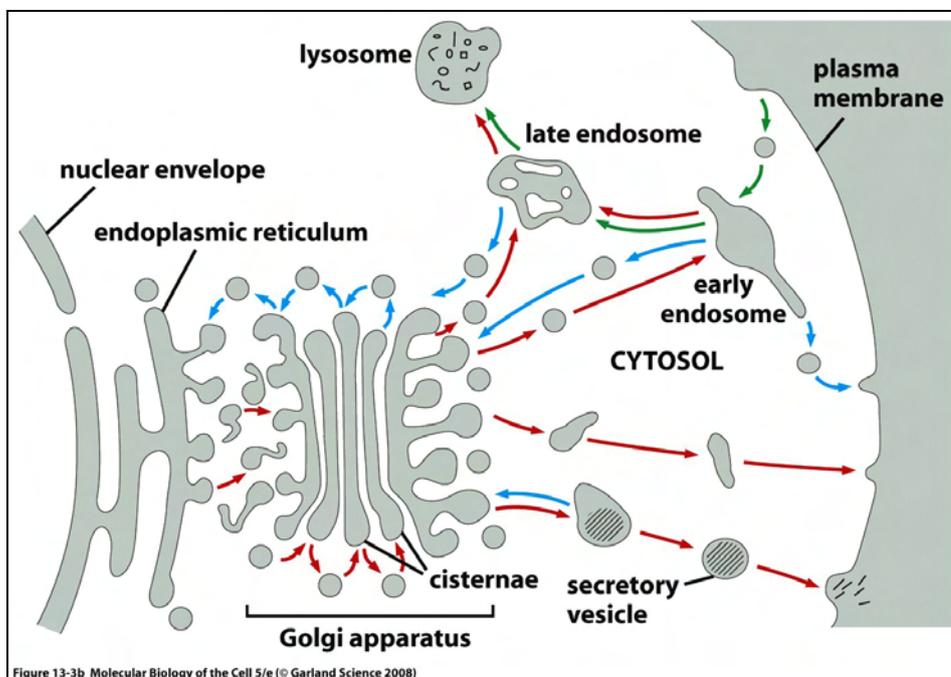


Abb. 5: „Landkarte“ des sekretorischen und endozytotischen Weges der Zelle.

Darstellung der beteiligten Zellkompartimente: Die Pfeile stellen den endozytotischen (grün), den sekretorischen (rot) Weg und reverse Transportrichtungen (blau) für den Rückfluss bestimmter Proteine dar (©2008 aus: „Molecular Biology of the Cell“, 5. E., von Alberts et al. Reproduziert mit Erlaubnis von Garland Science & Taylor and Francis LLC).

Die nach der Translation in der Membran oder im Lumen des ER angereicherten Proteine werden mithilfe der im ER angesiedelten Enzyme gefaltet, glykosiliert und auf vollständige und korrekte Faltung überprüft. Bei korrekter Faltung ergibt sich ein Signal zur Anreicherung in „COP II coated“ Vesikeln (Durchmesser ca. 50 nm). Darüber hinaus werden im Lumen des ER lokalisierte Proteine ohne spezifisches Signal mit einer niedrigeren Effizienz in „COP II coated“ Vesikel gepackt (unspezifischer Transport).

Die Vesikel schnüren sich an sogenannten „ER exit sites“ (Bereiche ohne Ribosomen) von der ER Membran ab und gehen in das ERGIC („ER und Golgi Intermediate Compartment“) über. Es handelt sich hierbei um ein Kompartiment, das aus vesikulären und tubulären Anteilen („Vesicular tubular clusters“, VTC) besteht und eine dynamische Verbindung zum Golgi-Komplex darstellt. Der Golgi-Komplex ist der Ort der Synthese und Prozessierung von Oligosacchariden und besteht aus einer geordneten Serie von Kompartimenten, die von Proteinen von cis nach trans durchlaufen werden. Nach Prozessierung im Golgi-Komplex kommen auf dem weiteren Transportweg im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) mehrere Wege in Frage (Abb. 6).

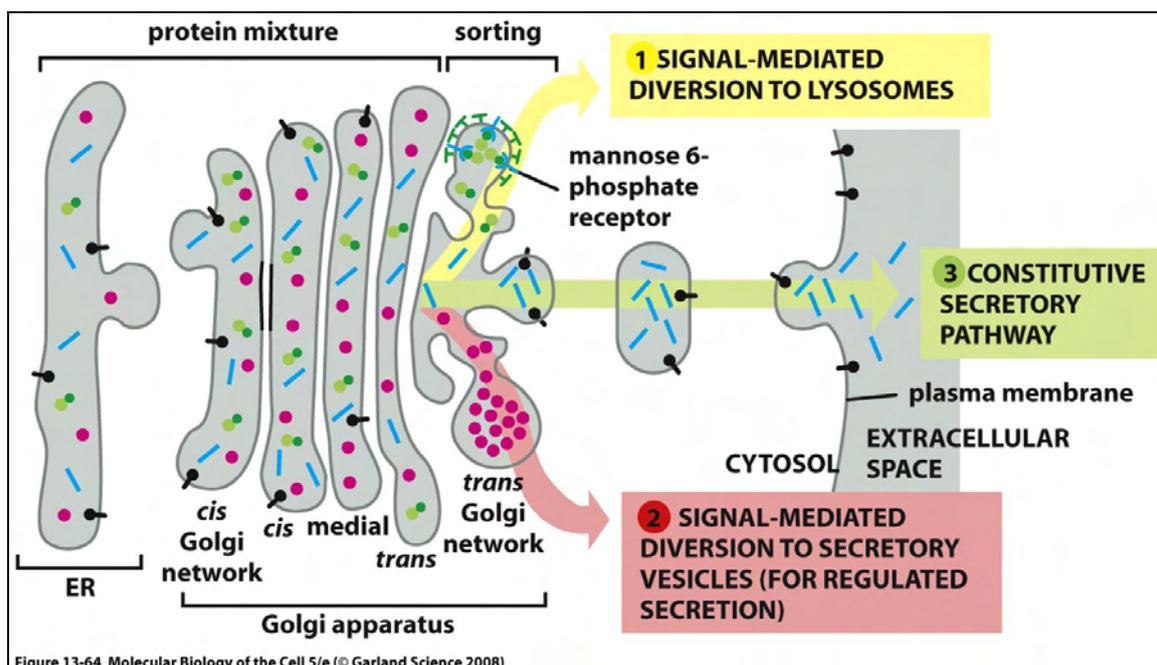


Abb. 6: Mögliche Wege im Trans-Golgi-Netzwerk.

Drei gut charakterisierte Wege für die Sortierung von Proteinen im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN). Signal induzierter Transport zu Lysosomen (1), Signal-vermittelte Abtrennung in sekretorischen Vesikeln für regulierte Sekretion (2), nur in sekretorischen Zellen) und Ausschleusung auf dem konstitutiven Weg über Exozytose (3). (©2008 aus: „Molecular Biology of the Cell“, 5. E., von Alberts et al. Reproduziert mit Erlaubnis von Garland Science & Taylor and Francis LLC).

Proteine mit einer Mannose 6-Phosphat Markierung werden in „Clathrin coated“ Vesikeln zu den Lysosomen transportiert (1), Proteine mit einem Signal für sekretorische Vesikel werden in diesen gesammelt und über den regulierten Sekretionsweg ausgeschleust (2, nur in sekretorischen Zellen) und Proteine ohne besondere Markierung werden in unpolarisierten Zellen automatisch auf dem konstitutiven Weg in Vesikeln aufgenommen und über Exozytose freigesetzt (3). Nach der Fusion des Transportvesikels mit der Zellmembran kann die Vesikelmembran sofort wieder zur Endozytose eingesetzt werden. Signalproteine werden entweder über retrograden Transport zurückgeführt oder in Lysosomen entsorgt (*Alberts et al., 2008*).

1.10 Ultrahistologische Darstellung der Morphogenese von Pestiviren

Um die Pestivirusmorphogenese und die Sekretion von Virionen besser verstehen zu können, bieten sich prinzipiell ultrahistologische Studien an infizierten Zellkulturen an. Allerdings konnten mit dieser Methode bisher kaum Aufschlüsse über den Reifungs- und Ausschleusungsprozess von Pestiviruspartikeln gewonnen werden. Die Schwierigkeit in der ultrahistologischen Untersuchung liegt vor allem im Vergleich z. B. zu Flaviviren darin, dass bei Pestivirusvermehrung in Zellkultur wenige Viruspartikel in infizierten Zellen gebildet werden.

In den 80er Jahren gab es einige Studien zur Ultrahistologie von pestivirusinfizierten Zellkulturen und Organen bzw. Leukozyten BVDV infizierter Kälber. Bereits 1982 berichteten *Bielefeldt Ohmann und Bloch*, dass in Zellen des Intestinums und der Nieren BVDV-infizierter Kälber virusähnliche Partikel in kleinen Vesikeln und größeren Vakuolen gefunden wurden, die in den Extrazellulärraum entleert wurden. Diese Ergebnisse sind allerdings kritisch zu sehen, da die Autoren das Auftreten dieser Partikel auch in nicht-infizierten Kontrollzellen einräumen. Später konnten dann in Lymphozyten und Monozyten persistent infizierter Tiere Viruspartikel in kleinen zytoplasmatischen Vesikeln nachgewiesen werden (*Bielefeldt Ohmann et al., 1987*). Studien mit BDV und BVDV in Zellkultur führten zu den ersten Aufnahmen von Pestiviruspartikeln im rER-Lumen (*Gray und Nettleton, 1987*). Die Entstehung der Virionen („Budding“) sowie die Ausschleusung aus der Zelle wurden bislang nicht beobachtet. Ein Nachweis extrazellulärer Pestivirionen an der Zellmembran gelang für KSPV in Zellkultur sowohl morphologisch als auch durch Immunogoldmarkierung des Hüllproteins E^{ms} (*Weiland, E. et al., 1992; Weiland, F. et al., 1999*). Interessanterweise gelang in diesem Zusammenhang der Nachweis des E2 Proteins an den extrazellulären

Virionen nicht, obwohl Antikörper zur Verfügung standen, die in anderen immunhistologischen Verfahren zu sehr guten Ergebnissen führten.

1.11 Einsatz der Elektronenmikroskopie (EM) in der Zellbiologie

Für ultrahistologische Untersuchungen zur Morphogenese von Viren in infizierten Zellen kommen verschiedene Verfahren in Frage. Dabei muss zwischen zwei Zielrichtungen unterschieden werden. Der erste Weg führt über stringente Fixierung und Einbettung in Epoxidharze unter Verlust von Antigenzugänglichkeit zu einer sehr guten Erhaltung und Darstellung der Zellmorphologie, die bei entsprechenden technischen Voraussetzungen auch die Rekonstruktion von dreidimensionalen Strukturen (Elektronentomografie) erlaubt (*Welsch et al., 2009*: Morphogenese von Flaviviren). Der Weg der klassischen Epoxidharzeinbettung wurde bei allen bisher veröffentlichten elektronenmikroskopischen Untersuchungen zu Pestiviren gewählt (Kapitel 1.10). Die Immunogoldmarkierung extrazellulärer Viruspartikel wurde durch eine Bindungsreaktion vor der Einbettung („Pre-Embedding“-Verfahren) erreicht (*Weiland, E. et al., 1992*; *Weiland, F. et al., 1999*).

Andere Verfahren zielen auf eine optimale Antigenerhaltung und Zugänglichkeit der Antigene nach Einbettung und Dünnschnittherstellung ab. Hierbei kann wiederum zwischen Einbettungen in Methacrylat-Kunststoffe und Gefriereinbettung unterschieden werden (*Griffiths, 2004*). In den 80er Jahren wurden Methacrylat-Kunststoffe entwickelt, die eine Einbettung unter Vermeidung hoher Temperaturen und starker Fixierung erlaubten. Diese Harze polymerisieren in der Kälte unter ultraviolettem (UV) Licht. Bekannte Vertreter sind „Lowicryl“ (Fa. Lowi) (*Carlemalm et al., 1982*) sowie „LR White“ und „LR Gold“ (Fa. London Resin Company) (*Causton, 1984*). Sie wurden z. B. in den Arbeiten von *Egger et al., 2002* zur Markierung von HCV-Proteinen und von *Kolesnikova et al.* für Studien zur Filovirusmorphogenese eingesetzt (*Kolesnikova et al., 2002*; *2004a*; *2004b*). Nachteile der Kunststoffeinbettungen liegen in der Toxizität der Komponenten (Arbeitsschutz) und in der vergleichsweise schlechten Strukturhaltung. Sie erreichen nicht das Ziel, den Zustand der lebenden Zelle abzubilden. Vor allem die Darstellung zellulärer Membranen ist mit dieser Methode sehr schwierig. Als Alternative wurden verschiedene Verfahren entwickelt, um den Zustand der Zelle im wahrsten Sinne des Wortes „einzufrieren“. Hierzu müssen Zellen im Hochdruck-Gefrierverfahren präpariert, Dünnschnitte in der Kryoultramikrotomie angefertigt und im Kryoelektronenmikroskop ausgewertet werden (*Chang et al., 1981*; *Mcdowall et al., 1983*).

Diese Methode hat allerdings neben einem hohen apparativen und technischen Aufwand den Nachteil, dass sie nicht die Anwendung von immunzytochemischen Methoden erlaubt. Daher kann bei Immunmarkierungen in der Ultrahistologie zur Strukturhaltung der Zellen sowie zum Schutz der Probe vor Manipulationen momentan nicht auf Temperaturen über 0 °C und chemische Fixierung verzichtet werden (*Griffiths, 2004; Möbius, 2009*). In Abb. 7 werden verschiedene Wege der Gefriereinbettung in der Elektronenmikroskopie dargestellt. Der Weg, der in dieser Arbeit zur Immunogoldmarkierung von Pestivirusproteinen an Zelldünnschnitten gewählt wurde, ist farblich hervorgehoben.

Im wesentlichen wird bei der verwendeten Methode, die nach dem Pionier auf diesem Gebiet in den 60er und 70er Jahren TOKUYASU-Methode genannt wird, Probenmaterial nach einer Fixierung mit Formaldehyd und Infiltration mit Saccharose (Gefrierschutz) in flüssigem Stickstoff ohne Einbettungsmedium eingefroren und konserviert. Im Anschluss werden in der Kälte bei -100 bis -120 °C Dünnschnitte angefertigt, die anschließend aufgetaut und bei Raumtemperatur zur Immunmarkierung eingesetzt werden können. Die Auswertung erfolgt in einem herkömmlichen Transmissionselektronenmikroskop ohne spezielle Kryovorrichtung (*Tokuyasu, 1973, 1976; Tokuyasu und Singer, 1976; Tokuyasu, 1978, 1980, 1983, 1986*).

Seit ihrer Etablierung ist die Methode von einigen Arbeitsgruppen weiterentwickelt worden. Studien zur Charakterisierung der Methode und zur Verbesserung der Schnitterhaltung (*Griffiths et al., 1984*) sowie Arbeiten zur Artefaktentstehung führten zu einem besseren Verständnis der Grundlagen (*Richter, 1994*). Mittlerweile sind Protokollvariationen anerkannt, die zu einer verbesserten Darstellung der Zellmorphologie führen (*Liou et al., 1996*) und gute Vorlagen für Immunmarkierungen bieten (*Slot et al., 1991*). *Griffith und Posthuma, 2002* haben gezeigt, dass angefertigte Schnittpräparate bis zu einem halben Jahr ohne Antigenitätsverlust bei 4 °C gelagert werden können. Seit 1996 wurde die Methode für die immunultrahistologischen Arbeiten zur Flavivirusreplikation und -morphogenese erfolgreich eingesetzt (*Mackenzie et al., 1996b*) (siehe Kap.1.7).

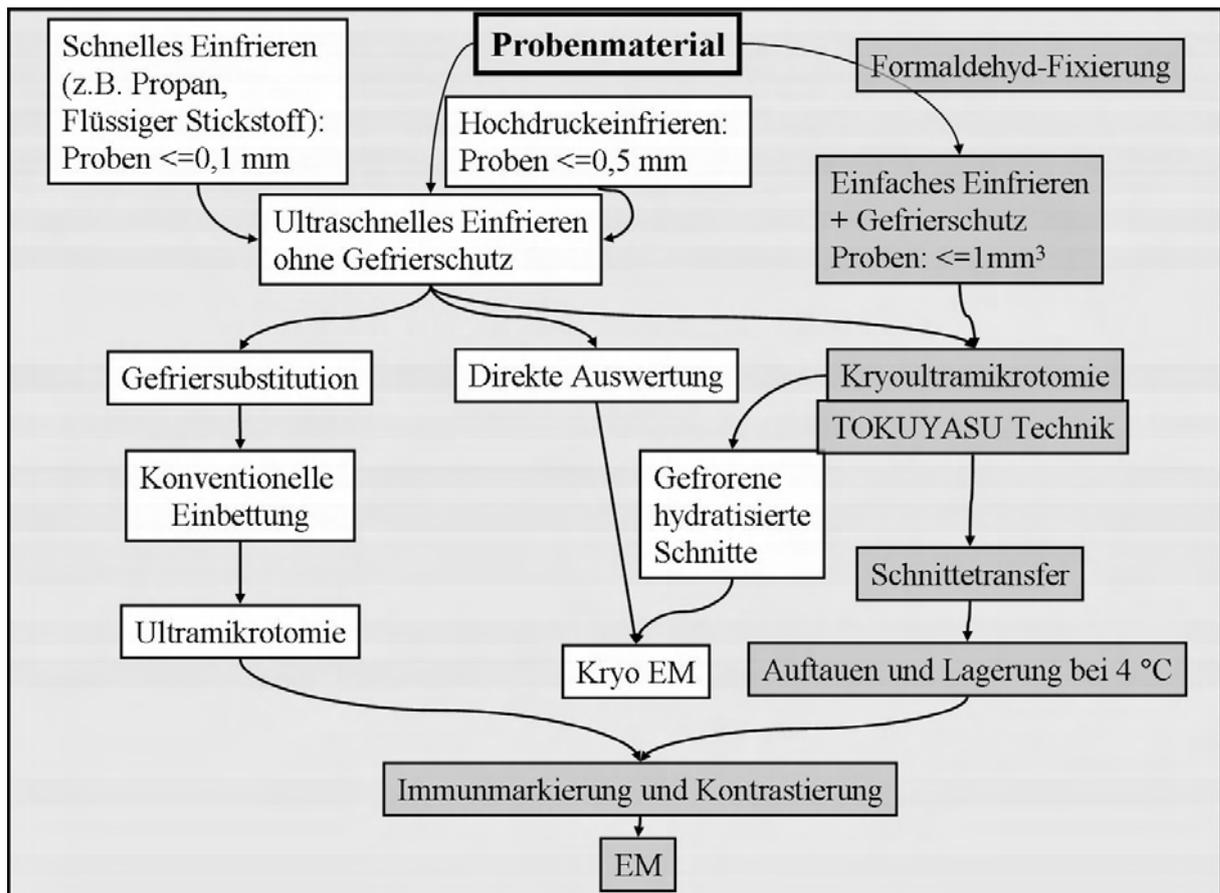


Abb. 7: Übersicht zu Kryoverfahren zur Einbettung von Geweben und Zellen in der Elektronenmikroskopie (EM).

Der in dieser Arbeit gewählte Weg zur Immungoldmarkierung von Dünnschnitten aus Kulturzellen ist farblich hervorgehoben.

2 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Morphologie und Morphogenese von Pestiviren durch Einsatz ultrahistologischer Verfahren zu beleuchten und besser zu verstehen. Die Arbeit gliedert sich in drei Teile, die im folgenden kurz erläutert werden.

Im ersten Teil der Arbeit sollten Infektionsmodelle erarbeitet werden, um ultrahistologische Studien an pestivirusinfizierten Zellen zu ermöglichen. Mithilfe molekularbiologischer und klassischer virologischer Verfahren sollte der Zeitraum der initialen Virusvermehrung bestimmt werden, um optimale Bedingungen für ultrahistologische Untersuchungen zu schaffen.

Im zweiten Teil der Arbeit dienen die zuvor etablierten Infektionsmodelle zur elektronenmikroskopischen Untersuchung. Ziel war die Darstellung der Virionenentstehung sowie des intrazellulären Transports und der Freisetzung. Als weiterer Aspekt sollte geklärt werden, ob bei der ultrahistologischen Untersuchung intrazelluläre Membranalterationen durch die Virusreplikation und Morphogenese, wie für Flaviren und Hepaciviren beschrieben, nachgewiesen werden können.

Im dritten Teil der Arbeit sollten antigenerhaltende Verfahren zum Nachweis von Pestivirusproteinen in infizierten Zellen eingesetzt werden. Zu Beginn der Arbeit stand am Institut für Virologie kein Verfahren zur Verfügung, durch das Ergebnisse mit guter Darstellung von Zellmorphologie und guter Markierungseffizienz erreicht werden konnten. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit Protokolle zu Methacrylat-Kunststoffeinbettungen sowie Gefriereinbettungen nach TOKUYASU eingeführt. Zur Etablierung der Verfahren wurden Zellkultursysteme gewählt, in denen (Pesti-)Virusproteine überexprimiert wurden. Die Methode nach TOKUYASU wurde schließlich zur Untersuchung pestivirusinfizierter Zellen ausgewählt. Am Institut stand eine Reihe von Antikörpern zum Nachweis verschiedener Pestivirusproteine zur Verfügung, die Aufschlüsse über die intrazelluläre Proteinverteilung in infizierten Kulturzellen erlauben sollten.

Schließlich sollten über Kollokalisationsexperimente mit Markierungen von Virusproteinen und zellulären Markerproteinen die Erkenntnisse zur intrazellulären Proteindistribution bestätigt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zellen

- BHK-21: “Baby hamster kidney” Zellen; American Type Culture Collection (ATCC-CCL-10)
- BHK-21p577: “Baby hamster kidney” Zellen, pTet-on Regulatorplasmid, Expression BVDV-1 “NADL” E2 (inkl. Influenza HA-Tag); T. Rümenapf, Institut für Virologie, FB Veterinärmedizin, Giessen
- MDBK: „Madin Darby bovine kidney“ Zellen; American Type Culture Collection (ATCC CCL-22)
- PK-15: “Porcine kidney” Zellen; American Type Culture Collection (ATCC CCL-33)
- SF-21: „Spodoptera frugiperda“ Schmetterling-Ovarialzellen: T. Lengsfeld, BFAV Tübingen
- SK-6: „Swine kidney“ Zellen; M. Hofmann, IVI, Mittelhäusern, Schweiz
- SK-6p830: „Swine kidney“ Zellen, pTet-on Regulatorplasmid, Expression BVDV-1 „ncp7“ E^{ms}-p7; T. Rümenapf, Institut für Virologie, FB Veterinärmedizin, Giessen

3.1.2 Virusstämme

- BVDV-1 „NADL“: erhalten von Dr. M. Collett (*Collett et al., 1988b*)
- BVDV-2 „890“: erhalten von Dr. J. F. Ridpath, Virology Cattle Research, National Animal Disease Center, USDA, Ames Iowa, USA
- Pestivirus “Giraffe-1”: erhalten von Dr. D. J. Paton, VLA Weybridge, UK
- KSPV “Alfort-Tüb”: erhalten von Dr. Ahl, BFAV Tübingen
- KSPV „Alfort-Tüb-JIV“: erhalten von Dr. P. Becher, Institut für Virologie, FB Veterinärmedizin, Giessen (*Gallei et al., 2008*)
- Tollwutvirus Stamm „CVS“: erhalten von Dr. M. König, Institut für Virologie, FB Veterinärmedizin, JLU Giessen. ATCC: VR 959.
- Infektiöser Klon BVDV-1 „cp7-388“: cDNS erhalten von Dr. P. Becher, Institut für Virologie, FB Veterinärmedizin, Giessen

Rekombinantes Autographa californica nuclear polyhedrosis Virus (AcNPV), Familie Baculoviridae, „AcNPV-890/E2“: erhalten von Dr. B. Makoschey (Intervet, Boxmeer, Niederlande)

3.1.3 Antikörper und Seren

3.1.3.1 Primär-Antikörper

Tab. 2: Auflistung der verwendeten Primär-Antikörper.

Sortierung nach Reihenfolge des Antigens im Pestivirusgenom, am Ende der Liste Antikörper gegen andere Antigene. Abkürzungen: IgG = Immunglobulin G, Kan. = Kaninchen, mAk = monoklonaler Antikörper, msp. = monospezifisch, n. b. = nicht bekannt, pAk = polyklonaler Antikörper.

verwendetes Antigen	Antikörper Bezeichnung	Typ	Herkunft
N ^{pro} , BVDV-1 „ncp7“	3H5	IgG1	B. Lamp, Institut für Virologie, FB Vet.Med., JLU Giessen
N ^{pro} , BVDV-1 „ncp7“	13B6	IgG1	B. Lamp, Institut für Virologie, FB Vet.Med., JLU Giessen
Core, BVDV-1 „ncp7“	GRS-C3 (1E5)	mAk, IgG2b	<i>Roman-Sosa, 2007</i>
Core, KSPV „Alfort-Tüb“	GRS-C1 (5H4)	mAk, IgG1	<i>Roman-Sosa, 2007, Heimann et al., 2006</i>
E ^{ms} , KSPV „Alfort-Tüb“	50F4	mAk, IgG1	J. Baumeister, Institut für Virologie, FB Vet. Med., JLU Giessen
E ^{ms} , KSPV „Alfort-Tüb“	24/16	mAk, IgG2a	<i>Weiland, E. et al., 1992</i>
E ^{ms} , KSPV „Alfort-Tüb“	Kan αE^{ms}	pAk, msp.	K. Elbers, BFAV Tübingen
E1, KSPV „Alfort-Tüb“	8F2#1	mAk, IgG2b	G. Roman-Sosa, Institut für Virologie, FB Vet.Med., JLU Giessen
E2, BVDV-1 „cp7“	SCR25	mAk, IgG2b	<i>Cedillo-Rosales, 2004</i>
E2, BVDV-1 „cp7“	SCR48	mAk, IgG2b	<i>Cedillo-Rosales, 2004</i>
E2, BVDV-1 „cp7“	SCR60	mAk, IgG1	<i>Cedillo-Rosales, 2004</i>
E2, BVDV-1 „cp7“	SCR95	mAk, IgG2b	<i>Cedillo-Rosales, 2004</i>
E2, BVDV-2 „890“	SCR4	mAk, IgG1	<i>Cedillo-Rosales, 2004</i>
E2, KSPV „Alfort“	Kan αE2	pAk, msp.	K. Elbers, Bundesforschungsanstalt für Viruskkrankheiten der Tiere (BFAV), Tübingen
E2, KSPV „Alfort“	A18	mAk, IgG2a	<i>Weiland, E. et al., 1990</i>
E2, BVDV-1 „NADL“	D5	mAk, IgG1	<i>Weiland, E. et al., 1989</i>

verwendetes Antigen	Antikörper Bezeichnung	Typ	Herkunft
E2, BVDV-1 „NADL“	1b31	mAk, IgG1	<i>Weiland, E. et al., 1989</i>
E2, KSPV „Alfort-Tüb“	F48	mAk IgG2a	<i>Weiland, E. et al., 1990</i>
NS2, KSPV „Alfort-Tüb“	9D11	IgG1	B. Lamp, Institut für Virologie, FB Vet.Med., JLU Giessen
NS3, BVDV „Singer“	Code1/4/7 (Pool)	mAks, IgG	E. Dubovi, Cornell University, NY, USA (<i>Corapi et al., 1990a</i>)
NS4A, KSPV „Alfort-Tüb“	10E10	IgG2b	B. Lamp, Institut für Virologie, FB Vet.Med., JLU Giessen
NS4A, „KSPV Alfort-Tüb“	4B7	IgG2b	B. Lamp, Institut für Virologie, FB Vet.Med., JLU Giessen
NS5A, „KSPV Alfort-Tüb“	3B10	IgG1	B. Lamp, Institut für Virologie, FB Vet.Med., JLU Giessen
NS5B, „KSPV Alfort-Tüb“	6D2	IgG1	B. Lamp, Institut für Virologie, FB Vet.Med., JLU Giessen
n.b., BVDV	2NB2, P4G11, P4A11 (Pesti)	mAk Pool	<i>Shannon et al., 1991</i>
n. b., BVDV	N2B12, INB5, PID8 (BVDV)	mAk Pool	<i>Shannon et al., 1991</i>
n. b., BVDV	P3F6 (rum. Pesti)	mAk	<i>Shannon et al., 1991</i>
Nukleoprotein, Tollwutvirus „PM 1503“	SE	Kan. pAk	<i>López Yomayusa, 2009</i>
dsRNS	J2	IgG2a	Lot J2-0702, English & Scien. Consulting, HR
Protein Disulfid Isomerase (PDI)	αPDI (Stressgen)	Kan. pAk	Stressgen/ Biomol, USA/ BRD
PDI, bovine Leber	αPDI (Sigma)	Kan. IgG	Sigma-Aldrich, USA

3.1.3.2 Sekundär-Antikörper/ Protein A Gold

Kaninchen (Kan.) anti Maus IgG (H+L, “heavy and light chain”), Brücken-Antikörper (BrAk), Fa. Rockland

Protein A, konjugiert mit kolloidalem Gold (5, 10 oder 15 nm) (= PAG), CMC Utrecht, NL

Ziege anti Kaninchen (Kan.) IgG (H+L), konjugiert mit Cy-3 Farbstoff, Fa. Dianova

Ziege anti Maus IgG (H+L), konjugiert mit Cy-3 Farbstoff, Fa. Dianova

Ziege anti Maus IgG (H+L), konjugiert mit kolloidalem Gold (10 nm), Fa. BBI

3.1.4 Enzyme

Restriktionsendonukleasen	Fa. NEB, Promega, Serva
RNaseOUT, 40 U/μl	Fa. Gibco
RNaseInhibitor	Fa. Takara
sp6-RNS-Polymerase	Fa. Takara
Superscript II RNase H- reverse Transkriptase 200 U/μl	Fa. Invitrogen
Biotherm Taq-Polymerase 5 U/μl	Fa. NaTuTec
Turbo DNaseI	Fa. Ambion

3.1.5 Oligonukleotide und Sonden

Alle Sequenzen für Primer und Sonden zum Nachweis von Pestiviren wurden der Dissertation von S. Cedillo-Rosales (*Cedillo-Rosales, 2004*) entnommen. Es wird ein 147 Basenpaare (Bp) langes Fragment aus dem 5'NTR-Bereich des Genoms amplifiziert. Die Primer und Sonden für den Nachweis der 18s-RNS Sequenz wurden mithilfe der Genbank und dem Programm Primer Express[®] (Applied Biosystems) ausgewählt. Es wird ein 74 Bp langes Fragment amplifiziert.

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma MWG und der Firma Qiagen/ Operon bezogen, TaqMan[®] Sonden wurden von der Fa. Applied Biosystems bezogen.

pv-03R	5' - TCCATGTGCCATGTACAGCAG - 3'
pv-02	5' - GTGGACGAGGGCATGCC - 3'
18s-01	5' - CGGAGAGGGAGCCTGAGAA - 3'
18s-02R	5' - GGGTCGGGAGTGGGTAATTT - 3'
pvTaq01	5' FAM - ACAGTCTGATAGGATGCTGCAGAGGCC - TAMRA 3'
pvTaq02	5' VIC - CAGGTCTCTGCTACACCCTATCAGGCTGTG - TAMRA 3'
18sTaq01	5' VIC - ACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGG - TAMRA 3'

3.1.6 Vorgefertigte Medien und Systeme

QIAshredder Zellysat-Homogenisatorsäulchen	Fa. Qiagen
RNeasy [®] RNS Präparations-Kit	Fa. Qiagen
SF900 II SFM Medium	Fa. Invitrogen
sp6-RNS Transkriptionskit	Fa. Takara
TaqManUniversal PCR Master Mix (2x)	Fa. Applied Biosystems

3.1.7 Chemikalien und Reagenzien

Agarose (Elektrophorese)	Fa. Gibco-BRL
Ammoniumchlorid	Fa. Serva
Bovines Serum Albumin (BSA)	Fa. Serva
Chloroform	Fa. Fluka
Dithiothreitol (DTT)	Fa. Fermentas
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fa. Sigma
DNS-Größenmarker (1 kb, 100 b)	Fa. Invitrogen
Ethanol	Fa. Roth
1-,2- Epoxypropan (Propylenoxid)	Fa. Roth
Ethidiumbromid	Fa. Roth
Gelatine	Fa. Roth
Glutardialdehyd (GA, 25 % Lsg.)	Fa. Roth
Glycin	Fa. Roth
Methylcellulose, 25 centipoises	Fa. Sigma
Natriumazid (NaN ₃)	Fa. Merck
Octyl-D-Glucopyranoside	Fa. Fluka
Orange-G	Fa. Fluka
Osmiumtetroxid, OSO ₄ (2 % Lsg.)	Fa. Roth
Paraformaldehyd (PFA)	Fa. Fluka
Penicillin/ Streptomycin	Fa. Sigma
Phenol	Fa. Appligene
Polyvinylpyrrolidon	Fa. Roth
Ribonukleosidtriphosphate (rNTPs)	Fa. Boehringer Mannheim
Saccharose	Fa. Fluka
Tanninsäure	Fa. Sigma
Trypanblau	Fa. Serva
Tween-20	Fa. Fluka
Uranylacetat	Fa. Merck
Wasser, RNase frei	Fa. Roth

3.1.8 Puffer, Lösungen und Harze

ABDB-A (Antibody dilution buffer-A)	1 % (w/v) BSA, 0,05 % (v/v) Tween 20, 0,01 % (w/v) NaN ₃ in 1x TBS, bei 4 °C gelagert
Auftragepuffer Gel-Elektrophorese	0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,1 % (w/v) Orange G, 30 % (v/v) Glycerin, H ₂ O ad 10 ml, -20 °C. Bei Verwendung Zugabe von 4 µl Ethidiumbromid
Bleicitrat-Lsg. nach REYNOLDS	1,33 g Pb(NO ₃) ₂ und 1,76 g Na ₃ (C ₆ H ₅ O ₇) [2 H ₂ O] zu 30 ml Aqua dd, 30 min Schütteln (<i>Reynolds, 1963</i>)
Cacodylatpuffer, 0,2 M, pH 7,2	50 ml Lösung A (42,8 g Na-Cacodylat auf 1 l Aqua dd), 4,2 ml 0,2 M HCl, 155 ml Aqua dd
DNS-Leiter	6 ml H ₂ O, 100 µl Tris/HCl (pH 7,5; 0,5 M), 50 µl 0,1 M EDTA (pH 8,0), 125 µl 1 % (w/v) Orange G, 50 µl 1 % (w/v) Bromphenolblau, 400 µl Glycerin, 200 µl DNS-Leiter
Epoxyd-Harz	16 g Epon 812, 8 g Epon Härter DDSA, 8,7 g Epon Härter MNA, 0,4 g Beschleuniger DMP-30 (alle Fa. Serva), aliquotieren und bei -20 °C lagern

LR-Gold	+ 0,1 % (w/v) Benzil zum Aushärten, beide Fa. London Resin Company Limited
Neb4-Puffer	Fa. NEB
OrangeG Loading Buffer (0,25 % (v/v))	2,5 ml OrangeG 1 % (w/v), 3 ml Glycerin, 4,5 ml H ₂ O
Paraformaldehyd- Stammlösung (16% (w/v))	16 g PFA in 90 ml Aqua dd, mit NaOH pH auf 7,4 einstellen, filtrieren und bei -20 °C lagern
Phosphate buffered saline deficient (PBS def.)	0,8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 0,2 g/l KH ₂ PO ₄ x H ₂ O, 1,15 g/l Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O in 950 ml Aqua dd, autoklaviert, bei 4 °C gelagert
Phosphatpuffer 0,2 M pH 7,4	19 ml Lösung A (27,6 g/l NaH ₂ PO ₄ xH ₂ O), 81 ml Lösung B (35,7 g/l Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O)
Pioloform Lsg. 0.4 % (w/v)	Pioloform-Pulver (Fa. Plano) in Ethylenchlorid (Fa. FLUKA) lösen, nach 24 h aufschütteln, im Dunkeln lagern
Puffer VIIIa (2,5x)	125 mM Tris (pH 8,3), 187,5 mM KCl, 7,5 mM MgCl ₂ , 25 mM DTT, 1,25 mM dNTPs, gelagert bei -20 °C
TBS (Tris buffered saline)	50 mM Tris, 0,85 % (w/v) NaCl, pH 7,6, bei 4 °C gelagert

3.1.9 Medien und Mediumzusätze für die Zellkultur

Doxyzyklin	Fa. ICN
Einfriermedium	10 % (v/v) DMSO in FKS
Fötale Kälberserum (FKS)	Fa. PAA Laboratories
Geneticinsulfat (G418)	Fa. Calbiochem
Insektenzellenmedium	1 l SF900II-Medium, 2 ml Penicillin/Streptomycin (500x), 200 µl Amphotericin (500x), bei 4 °C gelagert
Penicillin/ Streptomycin (500x)	50000 IU/ml Penicillin G, 50 mg/ml Streptomycinsulfat; in Aqua dd gelöst; sterilfiltriert (0,1µm) und bei -20 °C gelagert
Trypsin-EDTA-Lösung	8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,44 g/l Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O, 2,5 g/l Trypsin, 1:300, 0,16 g/l Phenolrot in Aqua dd gelöst, sterilfiltriert (0,1 µm), bei 4 °C gelagert
Zellkulturmedium CCM-34	Zellkulturmedium DMEM plus 0,0178 g/l L-Alanin, 0,7 g/l Glycin, 0,025 g/l L-Prolin, 0,1 mg Biotin, 0,025 g/l Hypoxanthin, sterilfiltriert, Lagerung bei 4 °C bei Anbruch Zugabe von Antibiotika: Penicillin 100.000 IU/l, Streptomycin 0,1 g/l
Zellkulturmedium DMEM	4,5 g/l DMEM-Pulver (Fa. Gibco, Invitrogen Incorporation) 0,075 g/l L-Glutaminsäure, 3,7 g/l NaHCO ₃ , sterilfiltriert, Lagerung bei 4 °C; bei Anbruch Zugabe von Antibiotika: Penicillin 100.000 IU/l, Streptomycin 0,1 g/l

3.1.10 Fotodokumentation

Agepon	Fa. Agfa
D19 (Negativentwickler)	Fa. Kodak
Dokumol (Negativfixierer)	Fa. Tetenal
Ilfospeed RC Deluxe (Fotopapier)	Fa. Ilford
Iso 163 Planfilm (Negative)	Fa. Kodak
PQ Universal (Papierentwickler)	Fa. Ilford
Papierfix Rapid Fixer (Papierfixierer)	Fa. Ilford

3.1.11 Geräte

Analysenwaage	Fa. Sartorius
Bedampfungsanlage	Fa. Balzers
Brutschrank Stericult 2000 (mit CO ₂ -Begasung)	Fa. Forma Scientific
Brutschrank (ohne CO ₂ -Begasung)	Fa. WTC Binder
CCD-Mikroskopkamera (F-View II), Dokumentationssoftware	Fa. SIS (Soft-Imaging System)
Diamantmesser für (Gefrier-) Ultramikrotomie	Fa. Diatome
Elektronenmikroskop EM 910	Fa. Zeiss
Elektrophorese Power Supply	Fa. Amersham
Elektroporationsgerät (Gene PulserII)	Fa. BioRad
Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axiovert und Filtermodule	Fa. Zeiss
Gefriergeräte (-20 °C, -70 °C)	Fa. Liebherr, Fa. Bosch
Gelkammern für Elektrophorese	Werkstatt des MZI, Giessen
Glaswaren	Fa. Schott
Invert-Mikroskop	Fa. Zeiss
Kühlschränke	Fa. Liebherr
Kryoultramikrotom „UC6/FC6“	Fa. Leica
Laborator 138 S (Präzisionsfachvergrößerer)	Fa. Durst
Magnetrührer	IKA-Werke
Mehrkanalpipetten	Fa. Biohit
Mehrkanaldispensierpipetten	Fa. Biohit
Messerbrecher "EM-KMR3"	Fa. Leica
Mikroliterpipetten (10, 20, 200, 1000 µl)	Fa. Gilson
Negativscanner "G4050 "	Fa. hp
PCR-Kabinett Holten Lamin Air/PCR Mini Typ HVPCR	Fa. Holten
Thermocycler GeneAmp PCR System2400	Fa. Applied Biosystems/ Perkin Elmer
Photometer Gene Quant II RNA/DNA Calculator	Fa. Pharmacia Biotech
Pipettierhilfe (Pipet Boy Plus)	Fa. Integra Bioscience
real time PCR Gerät ABI Prism 7000, Dokumentationssoftware	Applied Biosystems
Reinstwasseranlage Purelab Plus UF	Fa. USF Deutschland GmbH
Schlauchpumpe (ECONO PUMP)	Fa. BIO RAD
Sicherheitswerkbank Klasse II	Fa. Clean Air
Trimmvorrichtung TM60	Fa. Spenger
Ultramikrotom „Ultracut“	Fa. Reichert
Vortex	Fa. IKA
Wasserbad WB10	Fa. Memmert GmbH & Co. KG
Zelleinfriergerät „Mr. Frosty“	Fa. Nalgene
Zentrifuge (4 °C) Kendro Megafuge 1,0R	Fa. Heraeus
Zentrifuge (4 °C) Biofuge Fresco	Fa. Heraeus
Zählkammer nach Fuchs-Rosenthal	Fa. Fisher Scientific

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkulturtechniken

3.2.1.1 Haltung der Zelllinien

Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen (Sicherheitswerkbank, Klasse II) durchgeführt. Bei allen verwendeten Zellkulturen (bis auf SF-21) handelt es sich um adhärenente Säugerzelllinien, die jeweils für 3-4 Tage in einem Inkubator bei 37 °C , 5 % CO₂ und wasserdampfgesättigter Luft in Zellkulturschalen (Ø 10 cm) gehalten und anschließend passagiert wurden. Hierzu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 10 ml Trypsin-EDTA-Lösung gewaschen, und anschließend die Zellkulturschalen mit 2 ml der selben Lösung 5-15 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen unter Zugabe von 10 ml frischem Medium (CCM-34 („cell culture medium“) außer BHK-21: DMEM „Dulbecco's modified Eagle medium)) mit 10 % Fötalem Kälberserum (FKS) (v/v) von der Kulturschale abgelöst und vereinzelt. Die Zellsuspension konnte nun zur Passagierung der Zellen oder für Infektionsversuche auf neue Schalen, bzw. Zellkulturplatten übertragen werden. pTet-on Zelllinien wurden unter Zugabe von G418-Sulfat (100 mg/l) gehalten.

Die adhärenente Insektenzelllinie SF-21 (Schmetterlings-Ovarialzellen) wurde bei 27 °C ohne CO₂-Begasung in Insektenzellenmedium in Zellkulturflaschen gehalten und alle 3-4 Tage passagiert. Hierzu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen in frischem Insektenzellmedium durch Abklopfen resuspendiert und zur weiteren Passagierung oder für Infektionsversuche in neue Zellkulturflaschen bzw. auf Zellkulturplatten übertragen.

3.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl einer Zellsuspension wurde nach Ablösen und Resuspendieren der Zellen in frischem Medium (siehe Kapitel 3.2.1.1) ein Aliquot im Verhältnis 1:10 mit Trypanblau-Färbelösung (0,25 % (w/v) in NaCl) versetzt und in einer Zählkammer nach Fuchs-Rosenthal unter einem Invertmikroskop ausgezählt. Die Auszählung berücksichtigte 4 große Quadrate der Kammer (Diagonale). Gezählt wurden nur lebende Zellen ohne Blaufärbung. Die Zellzahl/ml wurde mit folgender Formel ermittelt:

$$\text{Zellzahl/ml} = n \times V \times 1250$$

n= Anzahl Zellen in 4 Großquadraten

V= Verdünnungsfaktor

3.2.1.3 Kryokonservierung von Zellen

Zur Konservierung von Zellen wurden diese nach Ablösen und Resuspendieren (siehe Kapitel 3.2.1.1) durch Zentrifugation vom Medium getrennt und je nach Zelldichte in 1-3 ml Einfriermedium aufgenommen (ca. 1×10^7 Zellen/ml) und in Kryoröhrchen abgefüllt. Zum schonenden Einfrieren wurden die Röhrchen mithilfe einer Einfrierbox („Mr. Frosty“, Fa. Nalgene) langsam (ca. $1 \text{ }^\circ\text{C/Min}$) bis $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ heruntergekühlt und anschließend über flüssigem Stickstoff gelagert.

Eingefrorene Zellen wurden im warmen Wasserbad schnell aufgetaut, in frischem Kulturmedium aufgenommen und in Kulturgefäße ausgesät.

3.2.2 Herstellung von Virusstocks

Pestivirusstämme wurden auf MDBK, PK-15 bzw. SK-6 Zellen vermehrt. Hierzu wurde das Medium einer 10 cm Kulturschale mit einem zu 80 % konfluentem Zellrasen entfernt, der Zellrasen ein Mal mit Medium (ohne FKS) gewaschen und Virus („multiplicity of infection“ (m. o. i.) <1) in 2 ml Medium (ohne FKS) auf die Zellen gegeben und 1 h im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurde mit Medium (mit 10 % FKS (v/v)) auf 10 ml aufgefüllt. Nach 2-3 Tagen konnte der virushaltige Überstand gewonnen werden; zellgebundenes Virus wurde durch drei Frier-Tau-Zyklen freigesetzt und nach Abzentrifugation (700 g, 5 min) von zellulären Bestandteilen dem Überstand hinzugefügt. Die Lagerung der Virusstocks erfolgte bei $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ und vor der Verwendung in Infektionsstudien wurde der Virustiter durch Endpunkttitration (siehe unten) bestimmt.

3.2.3 Titration von Pestiviren

Virustitrationen wurden direkt in 96well Platten durchgeführt. Hierzu wurde eine geometrische Verdünnungsreihe des Virus (1:5 in 5er Schritten) mit 4 Replikaten angelegt. Anschließend wurde 50 μl Zellsuspension pro Vertiefung hinzugegeben (2×10^5 Zellen/ml, siehe Kapitel 3.2.1.2) und der Ansatz für 3 Tage bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 % CO_2 und wasserdampfgesättigter Atmosphäre im Brutschrank inkubiert. Das Ablesen der Titration erfolgte bei zp Pestiviren über die Identifikation des virusspezifischen zpE und bei nzp Pestiviren über den indirekten Immunfluoreszenztest (IIFT, siehe Kapitel 3.2.4).

Der Virustiter wurde mit einer vereinfachten Formel, abgeleitet von SPAERMANN und KÄRBER (*Kärber, 1931*), berechnet und mit der Einheit „Tissue Culture Infectious Dose 50/ml“ (TCID₅₀/ml) angegeben:

$$m = \log_{10} d^{(\sum R_i + 0,5)}$$

m = negativer dekadischer Logarithmus des Titers bezogen auf das Testvolumen (100 µl)

d = Verdünnungsfaktors (hier: 1:5)

$\sum R_i$ = Summe der Reaktionsraten

Die Varianz der Titer wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Varianz} = 2 \times \sqrt{(d^2 \times (p_1 + p_2 + p_3 + \dots))}$$

d = log der Verdünnung

$$p = \frac{\text{Anteil positiver Kulturen einer Verdünnungsstufe}}{\text{Anteil positiver Kulturen einer Verdünnungsstufe}} \times (1 - \text{Anteil positiver Kulturen einer Verdünnungsstufe}) : (\text{Anzahl Ansätze} - 1)$$

Beispiel:

Titration 1:5 in 5er Schritten mit 4 Ansätzen,

Anteil positiver Kulturen: Stufe 1= 1, Stufe 2= 0,75, Stufe 3= 0,5

$$p_1 = 1 \quad \times (1-1) \quad : (4-1) = 0$$

$$p_2 = 0,75 \quad \times (1-0,75) \quad : (4-1) = 0,0625$$

$$p_3 = 0,5 \quad \times (1-0,5) \quad : (4-1) = 0,0833$$

$$\text{Varianz des Titers} = 2 \times \sqrt{(0,699^2 \times (0 + 0,0625 + 0,0833))} = 0,534$$

3.2.4 Indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT)

Zum Nachweis von Pestivirusproteinen in Kulturzellen „in situ“ im lichtmikroskopischen Bereich wurde ein indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT) durchgeführt. Hierzu wurde der infizierte Zellrasen nach dem Abnehmen des Überstandes mit PBS ohne Ca⁺⁺/ Mg⁺⁺ (PBS def.) gewaschen und mit 2 % (w/v) PFA in PBS def. für 20 min bei 4 °C fixiert. Im Anschluss wurde das Fixans entfernt und der Zellrasen 3x mit PBS def. gewaschen. Zur Permeabilisierung wurden die Zellen mit 0,5 % Octylglucosid-Lösung (0,5 % (w/v) Octyl-D-Glucopyranosid in PBS def., bei 4 °C gelagert) für 5 min bei Raumtemperatur überschichtet.

Danach wurde der Zellrasen wieder 3x mit PBS def. gewaschen, in der Folge der Primär-Antikörper (Ak), verdünnt in ABDB-A Puffer, auf den Zellrasen gegeben und der Ansatz bei 37 °C im Brutschrank 1 h inkubiert. Nach 3x Waschen mit PBS def. wurde der Detektionsantikörper (Ziege anti Maus bzw. Kaninchen, konjugiert mit Cy3; 1:500 in ABDB-A Puffer verdünnt) auf den Zellrasen gegeben und der Ansatz wiederum bei 37 °C im Brutschrank für 1 h inkubiert. Nach abschließendem Waschen mit PBS def. erfolgte die Auswertung unter einem Invert-Fluoreszenzmikroskop bei Grünanregung (ca. 552 nm). Eine spezifische Fluoreszenz für Pestivirusproteine wurde ausschließlich im Zytoplasma der Zellen beobachtet, das Verteilungsmuster war abhängig vom nachgewiesenen Antigen. Ein Zellrasen wurde als positiv gewertet, wenn mindestens eine Zelle mit spezifischer Fluoreszenz beobachtet wurde. Bei jedem Ansatz wurden Negativ- und Positivkontrollen mitgeführt.

3.2.5 Infektions- und Expressionsmodelle

3.2.5.1 Infektionsversuche zur Erstellung von Wachstumskurven

Infektionsstudien wurden zur Erstellung von Wachstumskurven und RNS-Quantifizierung mit den Pestiviren BVDV-1 „NADL“, BVDV-2 „890“ und „Giraffe-1“ durchgeführt. Hierzu wurden MDBK-Zellen in Suspension gebracht und gezählt. Daraufhin wurden die Zellen pelletiert (500 g/ 5 min) und in möglichst kleinem Volumen von virushaltigem Zellkulturüberstand (4 °C) mit einer m. o. i. = 10 resuspendiert. Zur Infektionssynchronisation wurde der Ansatz 1 h bei 4 °C (Adhäsion) und im Anschluss 1 h bei 37 °C (Infektion) unter ständigem Schwenken inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen durch 2maliges Pelletieren (s. o.) und Resuspendieren in Zellkulturmedium (mit 5 % FKS (v/v)) gewaschen und danach mit Zellkulturmedium (mit 5 % FKS (v/v)) auf das gewünschte Endvolumen mit 5×10^5 Zellen/ml eingestellt. Nun wurden 2 ml der Suspension zur Bestimmung des Nullwertes entnommen, durch Zentrifugation (500 g, 5 min) der Überstand von den Zellen getrennt und zur späteren Titerbestimmung bei -70 °C eingefroren, während das Zellpellet sofort in 500 µl RNS-Lysispuffer (RLT, RNeasy[®]RNS Präparations-Kit) zur weiteren Verwendung in der real time RT-PCR (siehe Kapitel 3.2.7) aufgenommen wurde. Die restliche Zellsuspension wurde zu je 2 ml auf Mini-Zellkulturschalen ausgesät und bei 37 °C, 5 % CO₂ und wasserdampfgesättigter Luft im Brutschrank bis zur Entnahme am Messzeitpunkt inkubiert. Pro Messzeitpunkt wurde eine Schale entnommen und der Zellrasen unter dem Invert-Lichtmikroskop im Hinblick auf Zelladhäsion und Ausbildung eines zpE beurteilt.

Der Überstand wurde abgenommen, zum Abtrennen von toten Zellen zentrifugiert und zur späteren Titerbestimmung bei -70 °C eingefroren, während der Zellrasen 2x mit PBS def. gewaschen und im Anschluss in 500 µl RNS-Lysispuffer aufgenommen wurde. Bei jeder Infektionsstudie wurde eine Negativkontrolle mit nicht-infizierten Zellen angesetzt und zum Zeitpunkt „Null“ und „letzter Messzeitpunkt“ wie für die infizierten Zellen beschrieben präpariert.

3.2.5.2 Infektionsversuche zur Einbettung für die Elektronenmikroskopie

Infektionsversuche zur Einbettung für die Elektronenmikroskopie wurden mit den Pestiviren BVDV-1 „NADL“, BVDV-2 „890“, „Giraffe-1“ (auf MDBK-Zellen), KSPV „Alfort-Tüb“ (auf PK-15 Zellen) und KSPV „Alfort-Tüb-JIV“ (auf SK-6 Zellen) durchgeführt. Für die Infektionsversuche mit dem Tollwutvirusstamm „CVS“ wurden BHK-21 Zellen (Zellkulturmedium: DMEM) verwendet. Für Flacheinbettungen wurden Zellen in Mini-Schalen ausgesät, für Blockeinbettungen wurden 10 cm Schalen verwendet. Bei jedem Ansatz wurden nicht-infizierte Zellen als Negativkontrollen mitgeführt. Die Zellen wurden 12-24 h vor der Infektion so ausgesät, dass der Zellrasen zum Zeitpunkt der Infektion 90-100 % konfluent war. Das Medium wurde abgenommen, der Zellrasen einmal mit Medium (ohne FKS) gewaschen und im Anschluss mit der entsprechenden Virussuspension mit einer m. o. i. zwischen 1 und 10 für 1 h bei 4 °C und im Anschluss 2 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde der Ansatz mit Medium (mit 10 % FKS (v/v)) aufgefüllt (Mini-Schalen 2 ml, große Schalen 10 ml) und bis zum gewählten Fixierungszeitpunkt für die EM-Präparation bei 37 °C, 5 % CO₂ und wasserdampfgesättigter Luft inkubiert. Die weiteren Schritte ab der Fixierung sind in Kapitel 3.2.8 beschrieben.

3.2.5.3 Transfektionsversuche zur Erstellung von Wachstumskurven und zur Einbettung für die Elektronenmikroskopie

Transfektionsversuche mittels Elektroporation zur Erstellung von Wachstumskurven und zur Einbettung für die Elektronenmikroskopie wurden mit replikationskompetenter RNS des BVDV-1 „cp7“ Gesamtklons (cp7-388) durchgeführt; die cDNS (komplementäre Desoxyribonukleinsäure) wurde freundlicherweise von P. Becher (Institut für Virologie, FB Vet.Med., Giessen) zur Verfügung gestellt. Bei jeder Elektroporation wurden Negativkontrollen (Elektroporation von MDBK-Zellen ohne cDNS) mitgeführt.

3.2.5.3.1 Präparation der RNS

Zunächst wurde die vorliegende cDNS in RNS transkribiert. Hierzu wurde zuerst ein *SmaI*-Verdau zur Linearisierung der cDNS durchgeführt:

cDNS	15 µl (0,29 µg/µl, pro Ansatz werden 4-5 µg verwendet)
SmaI	8 µl (Enzym, als letztes zugeben)
Neb4	12 µl (Puffer, 1/10 des Ansatzes)
H ₂ O	85 µl
Gesamt	120 µl

Der Ansatz wurde durch vortexen gemischt, 1,5 h auf einem Wärmeblock bei 30 °C inkubiert und danach sofort auf Eis gestellt. Zur Kontrolle des Verdau wurde eine Gel-Elektrophorese (1 % Agarosegel, 3 µl cDNS, 4 µl OrangeG loading buffer; 100 V, 35 min) durchgeführt. Parallel dazu wurde eine Phenol/ Chloroform- Reinigung zur Entfernung der Puffer und Enzyme aus dem *SmaI*-Verdau durchgeführt. Der Ansatz (120 µl) wurde mit Aqua dd auf 400 µl aufgefüllt und mit 400 µl Phenol (+ 0,1 % (w/v) Hydroxychinolin) überschichtet, geschüttelt und zentrifugiert (13000 U, 5min). Danach wurde die obere Phase vorsichtig abgenommen und in einem neuen Gefäß mit 400 µl Chloroform überschichtet, geschüttelt und zentrifugiert (s.o.). Im Anschluss wurde für eine Ethanol-Fällung die obere wässrige Phase vorsichtig abgenommen, in einem neuen Gefäß mit 1 ml 100 % Ethanol und 40 µl 3 M KCl vermischt und über Nacht zum Ausfällen bei -20 °C gelagert. Am nächsten Tag wurde der Ansatz nach dem Auftauen zentrifugiert (13000 U, 1 h), im Anschluss wurde die Flüssigkeit vollständig abgenommen, 200 µl Ethanol (70 % (v/v)) vorsichtig auf das Pellet gegeben und der Ansatz wiederum zentrifugiert (13000 U, 5 min). Die Flüssigkeit wurde wieder abgekippt, das Pellet in 22 µl Wasser (RNase frei, Fa. Roth) aufgenommen und zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt oder bei -20 °C eingefroren.

Die Reaktion für die *in vitro* Transkription wurde wie folgt angesetzt:

10fach sp6-Puffer	4 µl
BSA 0,1 % (w/v)	4 µl (1/10 des Gesamtansatzes)
DTT 100 mM	4 µl (1/10 des Gesamtansatzes)
rNTPs 5 mM	4 µl (1/10 des Gesamtansatzes)
RNase Inhibitor	1 µl
linearisierte DNS	21,5 µl (Ansatz – 0,5 µl für Probel)
sp6-Polymerase	2 µl (zuletzt!)
Gesamt	40,5 µl

Der Ansatz wurde durch vortexen gemischt, 1 h auf einem Wärmeblock bei 37 °C inkubiert und danach sofort auf Eis gestellt oder bei -20 °C gelagert.

Zur Kontrolle der Transkription wurde eine Gel-Elektrophorese (1 % (w/v) Agarosegel, 2 µl RNS, 4 µl OrangeG loading buffer; 100 V, 35 min) durchgeführt.

Zur Mengenbestimmung der transkribierten RNS wurde zunächst ein DNS-Verdau (5,5 µl Aqua dd, 4 µl Transkript, 0,5 µl TurboDNase) bei 37 °C auf einem Wärmeblock für 15 min durchgeführt, gefolgt von einer weiteren Phenol-Chloroform Reinigung (10 µl Ansatz + 390 µl Aqua dd) wie oben beschrieben. Das Pellet wurde anschließend in 100 µl RNase freies Wasser aufgenommen und die optische Dichte (OD) in einem Photometer bei 260 nm gemessen. Aus dem gemessenen OD-Wert wurde die Konzentration der RNS-Menge berechnet ($OD_{260} \times 4 = \text{RNS in } \mu\text{g/ } \mu\text{l Transkript}$).

3.2.5.3.2 Elektroporation

Am Vortag wurden MDBK-Zellen auf großen (\varnothing 10 cm) Zellkulturschalen so umgesetzt (1:3), dass der Zellrasen am Tag der Elektroporation konfluent war. Das Medium wurde abgenommen, die Zellen trypsiniert und in 5 ml PBS def. resuspendiert, vereinzelt und in zwei Portionen aufgeteilt. Danach wurde der Überstand durch Zentrifugation (2000 U, 4 min) entfernt, die Zellen nochmal mit PBS def. gewaschen und im Anschluss mit PBS def. auf ein Volumen von 400 µl eingestellt, 4 µl RNS dazugegeben (nicht bei Negativkontrollen) und gemischt. Die Suspension wurde in eine Elektroporationskammer pipettiert und bei 180 V und 950 µF mit dem Genepulser transfiziert. Anschließend wurden die transfizierten Zellen mit Medium (CCM-34 mit 10 % FKS) aus der Küvette herausgespült, auf das benötigte Endvolumen eingestellt und auf Mini-Zellkulturschalen ausgesät. Die Entnahme der Proben an den Messzeitpunkten erfolgte wie in Kapitel 3.2.5.1 beschrieben.

Zur Einbettung von Zellen für die Elektronenmikroskopie wurden die Zellen ebenfalls in Mini-Schalen (Flacheinbettung) ausgesät. Die weiteren Schritte ab der Fixierung sind in Kapitel 3.2.8 beschrieben.

3.2.5.4 Expression pestiviraler Strukturproteine mit dem Tet-on Expressionssystem

Zur Einbettung für die Elektronenmikroskopie wurden Versuche mit pTet-on Expressionssystemen durchgeführt. Durch die Überexpression pestiviraler Strukturproteine sollte die Etablierung immunelektronenmikroskopischer Nachweisverfahren ermöglicht werden. Die verwendeten Zelllinien SK-6p830 und BHK-21p577 wurden freundlicherweise von T. Rügenapf (Institut für Virologie, FB Vet. Med., Giessen) zur Verfügung gestellt. Sie enthalten ein pTet-on Regulatorplasmid, das eine G418 Resistenz beinhaltet.

Das Plasmid kodiert das Gen für das Regulatorprotein „Reverser tetrazyklin-kontrollierter Transaktivator“ (rtTA), welches eine induzierbare Transkription eines Gens durch die Zugabe des Tetrazyklin-Derivates Doxyzyklin erlaubt.

Die SK-6p830 Zelllinie exprimiert die Pestivirus-Strukturproteine E^{ms} - E1 - E2 - p7 (BVDV-1 „ncp-7“). Die BHK-21p577 Zelllinie exprimiert das Pestivirusprotein E2 mit einem zusätzlichen HA-Membrananker am C-Terminus (HA: Hämagglutinin-Protein von Influenzaviren, Signalprotein für Transport zur Plasmamembran).

Zur Induktion der Genexpression wurden Zellen am Vortag so ausgesät, dass der Zellrasen am Versuchstag 80-90 % konfluent war. Für Flacheinbettungen wurden die Zellen in Mini-Schalen und für Blockeinbettungen in großen Schalen ausgesät. Zur Induktion wurde dem Medium (CCM-34 mit 10 % FKS (v/v) und 100 mg/l G418-Sulfat) Doxyzyklin (2,5 µl/ml) zugegeben und die Schalen bei 37 °C, 5 % CO₂ und wasserdampfgesättigter Luft im Brutschrank für 24 h bis zur Fixierung inkubiert. Die weiteren Schritte ab der Fixierung sind in Kapitel 3.2.4 (IIFT) und 3.2.8 (EM) beschrieben.

3.2.5.5 Baculovirus-Expressionsversuche für den IIFT und zur Einbettung für die Elektronenmikroskopie

Es wurden Infektionsversuche mit dem rekombinanten Baculovirus „AcNPV-890/E2“ durchgeführt, bei dessen Vermehrung in den SF-21 Zellen das E2 Strukturprotein des BVDV-2 Stammes „890“ exprimiert wird. Durch die Überexpression des Proteins sollte die Etablierung immunelektronenmikroskopischer Nachweisverfahren ermöglicht werden. Der konfluente SF-21 Zellrasen wurde abgelöst, resuspendiert, gezählt und auf eine Zellzahl von $1,5 \times 10^6$ Zellen/ ml eingestellt. Je 2,5 ml Zellsuspension wurden in kleine (25 cm²) Zellkulturflaschen ausgesät und 1 h bei Raumtemperatur zur Adhäsion stehen gelassen. Im Anschluss erfolgte die Infektion mit 1,5 ml virushaltigem Zellkulturüberstand (Titer: 10^3 PFU „plaque forming units“/ ml). Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei Raumtemperatur wurden die Flaschen mit 4 ml frischem Insektenzellmedium aufgefüllt und für 72 h bei 28 °C ohne CO₂-Zufuhr im Brutschrank inkubiert. Zur Erfolgskontrolle der Infektion wurden parallel Infektionsansätze in Mini-Schalen mitgeführt, die 24 h, 48 h und 72 h p. i. mittels IIFT auf die Expression von Pestivirusproteinen untersucht wurden. Die weiteren Schritte ab der Fixierung sind in Kapitel 3.2.4 (IIFT) und 3.2.8 (EM) beschrieben.

3.2.6 Kinetik der Virusvermehrung

Die initiale Phase der Virusfreisetzung in infizierten Zellen wurde mit Hilfe von Vermehrungskinetiken untersucht. Zur Erstellung von Wachstumskurven wurden die Überstände aus den Infektions- bzw. Transfektionsstudien (3.2.5.1 bzw. 3.2.5.3) eingesetzt und Zellreste durch Zentrifugation entfernt. Der Virustiter wurde durch Endpunkttitration, wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben, bestimmt. Die Ergebnisse wurden in einer Microsoft[®] excel-basierten Grafik dargestellt.

3.2.7 Quantitative real time Polymerase Kettenreaktion (qrt PCR)

3.2.7.1 RNS-Präparation aus Zellen für die real time PCR

Zur RNS Präparation wurden das RNeasy[®] RNS Präparations-Kit und QIAshredder Zellysat – Homogenisator-Säulchen (Fa. Qiagen) verwendet. Zellen aus Infektions- und Transfektionsversuchen (siehe Kapitel 3.2.5.1 und 3.2.5.3) wurden in Mini-Schalen gehalten, am gewählten Messzeitpunkt das Kulturmedium entfernt, der Zellrasen 2x mit PBS def. gewaschen und die Zellen in 500 µl RNS-Lysispuffer (RLT) vollständig lysiert. 350 µl davon wurden auf Homogenisatorsäulchen gegeben und bei 13000 U für 3 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde bei -20 °C zur späteren Aufarbeitung eingefroren oder direkt mit 1 Vol 70 % Ethanol (v/v) versetzt. Der Ansatz (700 µl) wurde auf eine RNS Präparationssäule überführt und bei 10000 U für 15 s zentrifugiert. Die Säule wurde nacheinander mit 700 µl Waschpuffer RW1 und zweimal mit 500 µl Waschpuffer RPE beschickt und jeweils zentrifugiert (s.o.); der letzte Zentrifugationsschritt erfolgte bei 13000 U für 2 min. Daraufhin wurde die Säule in ein frisches 1,5 ml Röhrchen überführt und die gebundene RNS mit 30 µl AVE-Puffer eluiert (10000 U, 1 min). Die RNS wurde zur sofortigen Weiterverwendung auf 4 °C oder zur Lagerung auf -20 °C überführt.

3.2.7.2 Reverse Transkription (RT)

Alle Reaktionsgemische für die RT-PCR wurden als Mastermixe (Protokoll siehe Tab. 3) angesetzt. Die Herstellung der Mastermixe erfolgte räumlich getrennt von der Durchführung der Reversen Transkription und der qrt PCR. Jeweils 14 µl Mastermix A und 5 µl der eluierten RNS wurden in 0,2 ml Röhrchen pipettiert. Der Ansatz wurde bei 94 °C für 3 min in einem Thermocycler denaturiert und danach auf 4 °C abgekühlt. 81 µl Mastermix B wurden jedem Ansatz zugegeben.

Die Ansätze wurden bei 45 °C für 30 min inkubiert, dann für 2 min auf 94 °C erhitzt und schließlich auf 4 °C abgekühlt. Die erhaltene cDNS wurde sofort verwendet, übrige Mengen wurden bei -20 °C für spätere Versuche gelagert.

3.2.7.3 qrt PCR

In der qrt PCR wurden Zellen aus Infektionsversuchen zur Wachstumskurvenerstellung im Modus „relative Quantifizierung“ untersucht. Zur Validierung wurden zuvor die in diesem Modus parallel laufenden qrt PCRs zum Nachweis von Pestivirus-Genom und von 18s-RNS (housekeeping gene) im Modus „absolute Quantifizierung“ getrennt von einander auf ihre Effizienz getestet. Hierzu wurden aus stark positiven Proben Verdünnungsreihen der cDNS in 10er Schritten (unverdünnt → 1:1000) zur späteren Berechnung der Standardkurve angelegt und wie Einzelproben in der qrt PCR untersucht. Bei jedem Lauf wurde RNS von nicht-infizierten Kontrollzellen sowie Wasserkontrollen mitgeführt.

Für jede qrt PCR wurde das folgende Protokoll verwendet: Jeweils 162 µl des real time PCR Mixes (siehe Tab. 3) wurden in 1,5 ml Röhrchen pipettiert und 18 µl der erhaltenen cDNS dazugegeben. Jede Probe wurde als Triplikat angesetzt, so dass 3x je 50 µl in die Vertiefungen der Streifen/ Platten pipettiert wurden. Ansätze zur Verwendung im Modus „relative Quantifizierung“ wurden sowohl mit dem 18s-RNS Mix als auch dem Pestivirus-RNS Mix pipettiert. Zum Nachweis des BVDV-1 Stammes „NADL“ wurde die Sonde „pvTaq01“ verwendet und zum Nachweis des BVDV-2 Stammes „890“ und „Giraffe-1“ die Sonde „pvTaq02“ (*Cedillo-Rosales, 2004*). Die Ansätze wurden in einem ABI Prism 7000 Sequence Detection System wie folgt inkubiert: 1 Zyklus: 2 min 50 °C, 10 min 95 °C, gefolgt von 40 Zyklen: 15 s 95°C, 1 min 60 °C.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der ABI Prism 7000 SDS Software „Absolute Quantifizierung (AQ)“ (Standardkurvenerstellung zum Effizienzvergleich) oder „Relative Quantifizierung (RQ)“ (Proben aus den Infektionsversuchen).

Tab. 3: Master-Mixe für die Reverse Transkription und für die real time PCR.

Reverse Transkription Mastermix A (Volumen in µl pro cDNS-Probe)	
Primer pv03R (50 µM)	1
Primer 18s02R (50 µM)	1
Aqua dd	12
Reverse Transkription Mastermix B (Volumen in µl pro cDNS-Probe)	
Puffer VIIIA (2,5fach)	40
RNaseOUT (40 U/µl)	0,5
Superscript RT (200 U/µl)	0,5
Aqua dd	40
Real time PCR Mix für 18s-RNS (Volumen in µl pro cDNS-Probe, x 3 für Triplikate)	
TaqManUniversal PCR Master Mix (2fach)	30
Primer 18s01 (50 µM)	0,6
Primer 18s02R (50 µM)	0,6
Sonde 18sTaq (5 µM)	3
Aqua dd	19,8
Real time PCR Mix für Pesti-RNS (Volumen in µl pro cDNS-Probe, x 3 für Triplikate)	
TaqManUniversal PCR Master Mix (2fach)	30
Primer pv02 (50 µM)	12
Primer pv03R (50 µM)	0,6
Sonde pvTaq01/ pvTaq02 (5 µM)	3
Aqua dd	19,8

3.2.8 Einbettungsverfahren für die Elektronenmikroskopie

3.2.8.1 Epoxid Kunstharz-Einbettung

Ein Hauptaspekt dieser Arbeit war die elektronenmikroskopische Untersuchung pestivirusinfizierter Kulturzellen zur Darstellung von Viruspartikeln. Hierzu wurden drei verschiedene Techniken zur Einbettung von Kulturzellen in Epoxid-Kunstharz durchgeführt. Abb. 15 in Kapitel 4.2.1 auf Seite 71 zeigt die unterschiedlichen Techniken im direkten Vergleich. Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse wurden hauptsächlich mit der doppelten Monolayer-Einbettung („Sandwich-Methode“) erzielt.

3.2.8.1.1 Blockeinbettung

Am ausgewählten Zeitpunkt p. i. wurden die Zellen einer 10 cm Schale mit Trypsin-EDTA-Lösung bzw. mit einem Zellschaber abgelöst (beschrieben in Kap. 3.2.1.1), in 2 ml frischem Zellkulturmedium (mit 5 % FKS-Zusatz) aufgenommen und darin pelletiert (2000 U, 5 min). Daraufhin wurde das Zellpellet 1x mit PBS def. gewaschen (Überstand abgießen, Zellen in PBS resuspendieren, 5 min bei 2000 U zentrifugieren, Überstand abgießen). Im Anschluss

wurde das Zellpellet mit 500 µl 2,5 % Glutardialdehyd (GA) (w/v) überschichtet und mindestens 20 min bei 4 °C fixiert. Im Anschluss wurde das GA abgenommen, das Zellpellet 2x mit PBS def. gewaschen (s. o.), mit 1 ml 2 % OsO₄ (w/v) überschichtet und 1 h im Dunkeln inkubiert. Dieser Inkubationsschritt führte zu einer Schwarzfärbung und guter Erkennbarkeit der Zellen. Nach Ende der Inkubationszeit wurde das OsO₄ entfernt, das Pellet 2x mit Aqua dd gewaschen (s. o.), anschließend der Überstand vollständig entfernt und das Röhrchen mit dem Pellet in ein Wasserbad (37 °C) verbracht. Nun wurde 1 Tropfen 3 % Agar (w/v) (aufgekocht und auf 45 °C gebracht) in das vorgewärmte Röhrchen gegeben und direkt in das Pellet eingerührt. Zum Aushärten des Pellets wurde das Röhrchen auf Eis gestellt, so dass im Anschluss der Pellet-Block gelöst und auf Parafilm in kleine Blöckchen mit 1 mm Kantenlänge geschnitten werden konnte. Darauf folgte die Entwässerung und Einbettung der Zellblöckchen:

- 30 % Ethanol (v/v), 15 min
- 50 % Ethanol (v/v)/ 1 % Uranyl-Acetat (UA) (w/v), 45 min (im Dunkeln)
- 70 % Ethanol (v/v), 15 min
- 96 % Ethanol (v/v), 15 min
- 100 % Ethanol, 30 min (2x)
- 100 % Epoxypropan, 15 min (2x)
- Epoxypropan/ Epoxid-Harz (1+1), 60 min (auf dem Schwenker)
- Epoxypropan/ Epoxid-Harz (1+2), über Nacht (bei 4 °C)
- 100 % Epoxid-Harz, 4-6 h (auf dem Schwenker).

Anschließend wurden die Zellblöckchen in mit Epoxid-Harz gefüllte Einbettungsförmchen überführt und in einem Ofen 48 h bei 60 °C und 24 h bei 40 °C ausgehärtet. Zur Herstellung einer geeigneten Schnittfläche wurde das fertige Kunststoffblöckchen in eine Trimmfräse eingespannt und solange zugeschnitten, bis das Zellpellet den angeschnittenen Bereich vollständig ausfüllte.

3.2.8.1.2 Flacheinbettung von doppeltem Monolayer („Sandwich“-Methode)

Am ausgewählten Zeitpunkt wurden die Kulturzellen auf Mini-Schalen 2x mit PBS def. gewaschen (s. o.), mit 2,5 % GA (w/v) für 5 min bei RT und im Anschluss mit frischem GA für mind. 20 min bei 4 °C fixiert. Nach 2x Waschen folgte eine Inkubation mit 1 ml 2 % OsO₄ (w/v) für 1 h bei RT im Dunkeln.

Dieser Inkubationsschritt führte zu einer Schwarzfärbung und guter Erkennbarkeit der Zellen. Anschließend wurde der Zellrasen 2x mit Aqua dd gewaschen (s. o.) und es folgte die Entwässerung und Einbettung in der Reihenfolge:

- 30 % Ethanol (v/v), 15 min
- 50 % Ethanol (v/v)/ 1 % UA (w/v), 45 min
- 70 % Ethanol (v/v), 15 min
- 96 % Ethanol (v/v), 15 min
- 100 % Ethanol, 30 min (2x)
- Ethanol/ Epoxid-Harz (1+1), 60 min (auf dem Schwenker)
- Ethanol/ Epoxid-Harz (1+2), 60 min (auf dem Schwenker)
- Ethanol/ Epoxid-Harz (1+3), über Nacht (bei 4 °C)
- 100 % Epoxid-Harz, 6 h (Füllhöhe ca. 3 mm, auf dem Schwenker).

Anschließend wurden die Ansätze in einem Ofen 48 h bei 60 °C und 24 h bei 40 °C polymerisiert. Danach wurde die ausgehärtete Kunststoffplatte mechanisch (mit Hammer und Meißel) oder thermisch (durch Tauchen in flüssigen Stickstoff) von der Kulturschale gelöst und je Schale zwei Blöckchen mit einer Kantenlänge von 3 x 10 mm herausgesägt. Hierbei wurde besonders auf die Unversehrtheit der zellhaltigen Unterseite geachtet. Einbettungsförmchen wurden mit einem Tropfen Epoxid-Harz befüllt, daraufhin das erste Blöckchen mit der zellhaltigen Seite nach oben hineingelegt und flüssiges Harz auf der Oberfläche des Blöckchens verteilt, so dass nun das zweite Blöckchen mit der zellhaltigen Seite nach unten daraufgelegt werden konnte. Mit einem weiteren Tropfen Epoxid-Harz wurde das Präparat von oben eingedeckt und in einem Ofen 48 h bei 60 °C und 24 h bei 40 °C ausgehärtet. Zur Herstellung einer geeigneten Schnittfläche wurde das fertige Kunststoffblöckchen in eine Trimmfräse eingespannt und solange zugeschnitten, bis beide Zellschichten im angeschnittenen Bereich enthalten waren.

3.2.8.1.3 Direkte Flacheinbettung von einfachem Monolayer

Zum ausgewählten Zeitpunkt wurden die Kulturzellen auf Mini-Schalen 2 x mit PBS def. gewaschen (s. o.) und mit Fixans (2,5 % GA (w/v), 0,4 % Tanninsäure (w/v), 1 % PFA (w/v) in 0,1 M Cacodylatpuffer) für 5 min bei RT und im Anschluss mit frischem Fixans für mindestens 20 min bei 4 °C inkubiert. Danach wurde der Zellrasen wieder 2x mit PBS def. gewaschen (s. o.) und im Anschluss mit 1 ml 1 % OsO₄ (w/v) für 1 h bei 4 °C im Dunkeln inkubiert.

Anschließend wurde der gut sichtbare Zellrasen 3 x mit Aqua dd gewaschen (s.o.), entwässert und eingebettet:

- 50 % Ethanol (v/v), 10 min (2 x, bei 4 °C)
- 70 % Ethanol (v/v), 10 min (bei 4 °C)
- 70 % Ethanol (v/v), 1,2 % UA (w/v), 90 min bei RT (Raumtemperatur)
- 90 % Ethanol (v/v), 10 min (2 x)
- 100 % Ethanol, 5 min (5 x)
- Ethanol/ Epoxid-Harz (2+1), 30 min
- Ethanol/ Epoxid-Harz (1+1), 30 min
- Ethanol/ Epoxid-Harz (1+2), 30 min
- 100 % Epoxid-Harz, 60 min.

Im Anschluss wurde das Epoxid-Harz größtenteils von der Kulturschale abgesaugt und aufgeschnittene Gelatine-Kapseln kopfüber auf den Zellrasen gestellt. Nach wenigen Stunden im Ofen bei 60 °C wurden die Kapseln mit Epoxid-Harz vollständig aufgefüllt und die Schale wurde für weitere 24 h zum Polymerisieren in den Ofen gestellt.

Die ausgehärteten Kunststoff-Kapseln wurden mechanisch (mit Hammer und Meißel) oder thermisch (durch Tauchen in flüssigen Stickstoff) von der Kulturschale gelöst. Zum Zuschneiden wurden die Blöckchen in eine Trimmfräse eingespannt und so zugeschnitten, dass der angeschnittene Bereich einen geschlossenen Teil des Zellrasens enthielt. Bei der Auswahl und im Umgang mit den Blöckchen wurde besonders auf die Unversehrtheit der zellhaltigen Unterseite geachtet.

3.2.8.2 „LR-Gold“ Acrylharz-Einbettung

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war der Nachweis von Virusprotein mithilfe der Immunelektronenmikroskopie. Für eine bessere Antigenerhaltung und -zugänglichkeit im Vergleich zur Epoxidharz-Einbettung wurden Zellen in „LR-Gold“ Acrylharz eingebettet, das in der Kälte und unter UV-Licht polymerisiert.

Kulturzellen einer 10 cm Schale wurden 1x mit PBS def. gewaschen (s. o.) und im Anschluss mit 4 % PFA (w/v) (4 ml, 3 min) anfixiert. 2 ml PFA wurden anschließend abgenommen, die Zellen in den verbleibenden 2 ml mit einem Zellschaber vorsichtig abgekratzt, in ein Röhrchen gegeben und sofort bei 7000 U/ min pelletiert. Im Anschluss wurde das Pellet 3x für 20 min mit PBS def. und zuletzt mit 50 mM NH₄Cl-Lösung (in PBS def.) für 30 min überschichtet.

Nun folgte die Entwässerung und Einbettung durch Überschichten des Zellrasens:

- 30 % Ethanol (v/v), 10 min (2 x)
- 50 % Ethanol (v/v), 10 min (2 x)
- 70 % Ethanol (v/v), 10 min (2 x)
- 90 % Ethanol (v/v), 10 min (2 x)
- 100 % Ethanol, 10 min (2 x)
- Ethanol/ „LR-Gold“ (1+1), 60 min
- 100 % „LR-Gold“, 60 min
- 100 % „LR-Gold“, über Nacht (bei 4 °C)

Im Anschluss wurde das Pellet in frischem LR-Gold (mit 0,1 % Benzil (w/v)) vorsichtig resuspendiert, in 0,2 ml Röhren überführt und 60 min bei 4 °C aufbewahrt. Die Polymerisation erfolgte in der Kälte (-20 °C) mit UV-Licht (Abstand Lampe - Kapseln = 12 cm) für drei Tage. Nach vollständiger Aushärtung wurden die Röhren vorsichtig aufgeschnitten, die Blöcke zum Zuschneiden in eine Trimmfräse eingespannt und so zugeschnitten, dass das Zellpellet den angeschnittenen Bereich vollständig ausfüllte.

3.2.8.3 Gefriereinbettung

Der Nachweis von Virusproteinen mithilfe Immunelektronenmikroskopie wurde weiterhin über die Präparations- und Markierungsmethode nach TOKUYASU durchgeführt. Hierzu wurden zum ausgewählten Zeitpunkt 5 ml des Kulturmediums einer 10 cm Zellkulturschale entfernt, durch 5 ml 2fach Fixans (4 % PFA (w/v), 0,4 % GA (w/v) in Phosphatpuffer) ersetzt und die Schale für 5 min zurück in den Brutschrank gestellt. Anschließend wurde das Gemisch durch 1fach Fixans (2 % PFA (w/v), 0,2 % GA (w/v) in Phosphatpuffer) ersetzt und die Schale 2 h bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde der Zellrasen 3x 2 min mit PBS def. und 3x 2 min mit 0,1 % Glycin ((w/v) in PBS def.) gewaschen. Je Schale wurden ca. 1,8 ml Gelatine (1 % (w/v) in PBS def.) zugegeben, die Zellen darin vorsichtig mit einem Zellschaber abgekratzt, in ein Röhren überführt und sofort pelletiert (3000 U, 4 min). Der Überstand wurde vollständig abgenommen und das Pellet in 1 ml vorgewärmter Gelatine (10 % (w/v) in PBS def.) vorsichtig resuspendiert und für 10 min in ein Wasserbad (37 °C) verbracht. Im Anschluss wurden die Zellen pelletiert (7000 U, 5 min) und danach sofort auf Eis gestellt. Nach dem Erstarren des Pelletblocks wurde das Röhren mit einer Rasierklinge aufgeschnitten und der Zell-/ Gelatineblock auf Parafilm (auf Eis) in kleine Blöckchen mit 1mm Kantenlänge geschnitten, die sofort in ein Röhren mit 2,3 M Saccharose (in 0,1 M Phosphatpuffer) überführt wurden.

Die Infiltration mit der Saccharose erfolgte über Nacht bei 4 °C auf einem Drehrad. Am nächsten Tag wurden die Blöckchen aus der Saccharose entnommen und unter einem Stereomikroskop auf Aluminiumpins (Fa. Leica) aufgesetzt, die unmittelbar nach dem manuellen Ausrichten der Blöckchen in flüssigen Stickstoff geworfen und auch für späteren Gebrauch darin gelagert wurden.

3.2.9 Anfertigung von Ultradünnschnitten

3.2.9.1 Präparation von Objektträgern (Netzchen) für die Elektronenmikroskopie

Gereinigte Glasobjektträger wurden für 5-10 s in ein mit Pioloform-Lösung (0,4 % (w/v) in Chloroform) gefülltes Becherglas getaucht (unter dem Abzug), zügig wieder entnommen und senkrecht zum Trocknen hingestellt, so dass ein dünner Flüssigkeitsfilm auf dem Glas zurückblieb. Sobald der Film getrocknet war, wurde er auf einer Seite in der Nähe des Glasrandes mit einer Skalpellklinge eingeritzt und angehaucht, daraufhin wurde das Filmstück durch Eintauchen des Objektträgers in einen mit Aqua dd gefüllten Trog von der Unterlage abgelöst, so dass der Film auf der Wasseroberfläche flottierte. Objektträgernetze (Cu-/Rho-Netze, 200 mesh) wurden mit der dunkleren, matten Seite dem Film zugewandt vorsichtig dicht nebeneinander aufgelegt (ca. 4 x 6 Netze pro Film). Die Netze wurden nun durch Eintauchen entweder eines Stückes Filterpapier (Verwendung für Kunstharzschnitte) oder eines Glasobjektträgers mit Plastikaufkleber (für Gefrierschnitte) vorsichtig von der Wasseroberfläche aufgenommen, ohne dass Falten im Kunststofffilm entstanden. Die Netzchen wurden auf einem Heizblock ca. 15 min getrocknet und im Anschluss in einem staubfreien Behälter aufbewahrt.

Der getrocknete Pioloformfilm auf den Netzen wurde zur Stabilisierung gegen den Elektronenstrahl mit Kohlenstoff in einem Vakuumverdampfer (10^{-3} - 10^{-2} Pascal) unter Hochspannung (2400 V / 90-100 mA) so lange bedampft, bis eine kaum sichtbare (Gefrierschnitte) bzw. leichte (Kunstharzschnitte) Graufärbung erreicht wurde.

Um die mit Kohlenstoff bedampfte Oberfläche zu hydrophilisieren, wurden die Netze für Kunstharzschnitte beglimmt, dadurch wurden Moleküle in der Kohlenstoffschicht ionisiert, so dass eine hydrophile Oberfläche entstand (Vakuum von 1-10 Pascal für 2-3 min).

3.2.9.2 Ultramikrotomie bei Raumtemperatur

Alle Schnitte von Blöcken nach Einbettung in Epoxid-Harz und nach Einbettung in LR-Gold-Acrylharz wurden bei Raumtemperatur in einem Ultramikrotom nach Trimmen mit einer Trimmfräse und manuellem Nachtrimmen mithilfe einer Rasierklinge angefertigt.

Die Größe der Schnitte lag bei einer Kantenlänge von etwa 500 µm. Die Dicke der Schnitte wurde anhand der Interferenzfarbe geschätzt, zur weiteren Untersuchung wurden Schnitte mit einer silbernen bis goldenen Farbe (ca. 80-120 nm) ausgewählt. Die Schnitte wurden mit einem Diamantmesser angefertigt, wobei entstandene Schnitte als Schnittbänder auf der Wasseroberfläche des Messertroges mit einer Wimper gesammelt wurden und in Gruppen von 8-16 Schnitten auf befilmte 200 mesh Netze (siehe Kap. 3.2.9.1) übertragen wurden. Nach dem Trocknen wurden die Netzchen im Falle von Epoxid-Harz Schnitten direkt kontrastiert (45 min 2 % UA (w/v) in feuchter Kammer/ im Dunkeln, u. U. zusätzlich 5 min Bleicitrat nach Reynolds), bzw. im Falle von Acrylharz Schnitten zunächst einer Immunogoldmarkierung (siehe Kap.3.2.10.2) zugeführt.

3.2.9.3 Kryoultramikrotomie nach TOKUYASU

Alle Schnitte nach Gefriereinbettung wurden in der Kälte in einem Ultramikrotom mit Gefriereinrichtung angefertigt. Zum Trimmen der Präparate wurden diese aus der Lagerung in flüssigem Stickstoff entnommen und die Schnittfläche im Mikrotom mit selbst hergestellten Glasmessern (Messerbrecher) auf eine zellreiche rechteckige Fläche mit einer Kantenlänge von 250x350 µm getrimmt. Im Anschluss wurde die Temperatur auf -110 °C eingestellt und mit einem Diamantmesser Gefrierdünnschnitte in einer Dicke von 60-100 nm hergestellt. Schnittbänder wurden mithilfe einer Wimper auf der Messerobenseite ausgerichtet und mit einem linsenförmigen Tropfen aus einer 1:1 Mischung von 2,3 M Saccharose (in 0,1 M Phosphatpuffer) und 2 % Methylcellulose ((w/v) in Aqua dd) in einer Öse (Drahtdicke 0,3 mm, Durchmesser 2,5 mm) abgenommen. Hierbei wurde darauf geachtet, dass der Zeitpunkt der Schnittaufnahme kurz vor dem Gefrieren des Tropfens gewählt wurde, um ein Anfrieren an das Messer zu verhindern und eine gute Schnittqualität zu erhalten. Im Anschluss wurde der Tropfen außerhalb der Kryokammer aufgetaut und auf einem befilmten 200 mesh Netz abgesetzt. Auf diese Art gewonnene Schnitte wurden bei 4 °C gelagert und im Anschluss für Immunogoldmarkierungen verwendet.

3.2.10 Indirekte Immunogoldmarkierung

Zum Nachweis von viralen oder zellulären Proteinen in den präparierten Kulturzellen wurden indirekte Immunogoldmarkierungen durchgeführt. Der Nachweis erfolgte über Primär-Ak und mit kolloidalem Gold gekoppelte Sekundär-Ak oder Protein A.

Kolloidales Gold stellt sich im elektronenmikroskopischen Bild als runde, elektronenundurchlässige (schwarze) Markierung dar und ist in unterschiedlichen Durchmesser erhältlich. In dieser Arbeit wurde kolloidales Gold in 5, 10 und 15 nm Größe eingesetzt.

Die folgenden Verfahren wurden durchgeführt:

- 1) „Pre-Embedding“ Markierungsverfahren, bei denen die Proteinmarkierung an unfixierten oder leicht anfixierten Zellen in der Kulturschale unmittelbar vor der Einbettung in herkömmliches Kunstharz erfolgt und eine Markierung ausschließlich extrazellulär erfolgen kann (z. B. an extrazellulären Viruspartikeln (VPs)).
- 2) „Post-Embedding“ Markierungen; dieser Begriff fasst alle Markierungsprotokolle zusammen, bei denen die Proteinnachweisreaktion nach der Einbettung am angefertigten Schnitt nach der Ultramikrotomie durchgeführt wird, wobei sowohl intrazelluläre als auch extrazelluläre Strukturen markiert werden können.

3.2.10.1 „Pre-Embedding“ Markierung an Kunstharzschnitten

Dieses Verfahren erlaubt ausschließlich extrazelluläre Markierungen. Zum ausgewählten Zeitpunkt wurde der Zellkulturüberstand von Minischalen (\emptyset 3,5 cm) mit infizierten Zellen bzw. nicht infizierten Kontrollzellen abgesaugt; alle weiteren Schritte bis zur Entwässerung wurden bei 4 °C durchgeführt. Die Zellen wurden mit einem in PBS verdünnten Primär-Ak für 120 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Im Anschluss wurde der Zellrasen 2x2 min mit PBS gewaschen und die Zellen mit einem goldgekoppelten Sekundär-Ak (Ziege anti Maus, 10 nm Gold) für 90 min in einer feuchten Kammer inkubiert, gefolgt von 2x Waschen mit PBS. Danach wurde der Zellrasen mit 2,5 % GA (w/v) in Cacodylatpuffer 30 min fixiert, gefolgt von 2x3 min Waschen mit Cacodylatpuffer und der erste Kontrastierung mit 1 % OsO₄ (w/v) für 60 min. Anschließend wurde der Zellrasen 2 x 5 min mit Aqua dd gewaschen, bevor die zweite Kontrastierung mit 0,5 % UA (w/v) über Nacht stattfand. Danach wurde eine Entwässerung und Flacheinbettung von doppeltem Monolayer in Epoxidharz wie in Kapitel 3.2.8.1.2 beschrieben durchgeführt (ohne UA-Zusatz in der Alkoholreihe).

3.2.10.2 „Post-Embedding“ Markierungen an Kunstharzschnitten

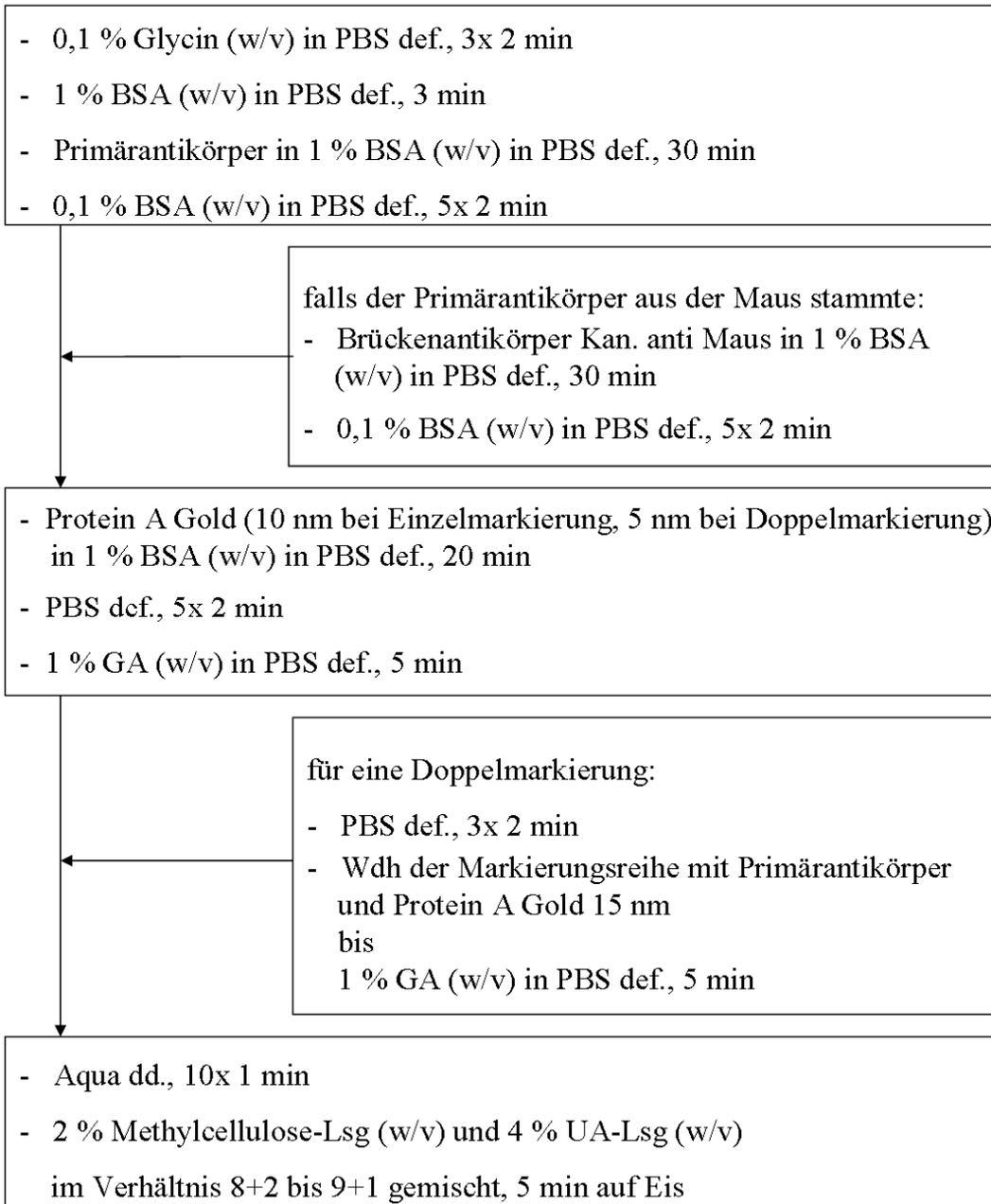
Indirekte Immunogoldmarkierungen wurden an Dünnschnitten nach Einbettung von Zellen in „LR-Gold“ Acrylharz durchgeführt. Hierzu wurden, wie in Kapitel 3.2.9.2 beschrieben, Dünnschnitte von infizierten (bzw. induzierten) und nicht infizierten (bzw. nicht induzierten) Zellen auf Objektträgernetzchen gesammelt und im Anschluss auf Tropfen (10-30 µl) einer Markierungsreihe in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert:

- 5 % BSA (w/v) in PBS def., 60 min
- 1. Ak verdünnt in PBS def. mit 0,5 % BSA (w/v), 0,05 % Tween-20 (v/v), 60 min 6x2 min Waschen in PBS def.
- 2. Ak (Ziege anti Maus, goldgekoppelt) verdünnt in PBS def. mit 0,5 % BSA (w/v), 0,05 % Tween-20 (v/v), 60 min
- 6x 2 min waschen in PBS def.
- 1 % GA (w/v) Fixierung in PBS def., 10 min
- 6x2 min waschen mit Aqua dd
- Trocknen der Schnitte
- 2 % UA (w/v) Kontrastierung, 3 min
- Bleizitrat nach Reynolds Kontrastierung, 30 s
- Spülen mit Aqua dd und Trocknen der Schnitte

Als Kontrolle wurden bei jeder Markierungsreihe nicht infizierte Zellen mit dem eingesetzten Primär-Ak getestet sowie eine Markierung von infizierten Zellen ohne Primär-Ak zum Ausschluss von unspezifischen Bindungen des Sekundär-Aks durchgeführt.

3.2.10.3 „Post-Embedding“ Markierung von Gefrierschnitten

Indirekte Immunogoldmarkierungen wurden an Gefrierdünnschnitten, hergestellt nach der TOKUYASU Technik (siehe Kapitel 3.2.9.3), durchgeführt. Hierzu wurden Dünnschnitte nach Lagerung bei 4 °C zunächst zur Entfernung der Gelatine für 20 min kopfüber auf 37 °C bis 40 °C warmes PBS def. in einer Petrischale gelegt. Im Anschluss wurden die Netze auf Tropfen (10-30 µl) einer Markierungsreihe in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert:



Im Anschluss wurden die Netze mit einer Öse (Drahtstärke 0,3 mm, Öse Ø 3,5 mm) vom Tropfen aufgenommen und auf Filterpapier ausgestrichen, so dass ein dünner Methylcellulose-Film zurückblieb und das Netz in der Öse hielt. Nun wurden die Netze getrocknet und anschließend mit einer Pinzette vorsichtig aus der Öse herausgelöst.

Bei jeder Markierungsreihe wurden Schnitte von negativen Kontrollzellen mit dem eingesetzten Primär-Ak sowie Schnitte positiver Zellen ohne Primär-Ak als Kontrollen mitgeführt.

3.2.11 Elektronenmikroskopische Untersuchung

Alle elektronenmikroskopischen Präparate wurden unter einem Transmissionselektronenmikroskop ausgewertet. Hierbei wurden zuerst die entsprechenden Negativkontrollen durchgemustert. Die Objektträgernetze wurden nach den folgenden Gesichtspunkten beurteilt:

- makroskopischer Zustand (Hinweise auf grobe Beschädigung?)
- Anzahl und Erhaltungszustand der Schnitte auf dem Netz (Lage der Schnitte, Faltenbildung, Risse?)
- Zelldichte/ Schnitt (einzelne Zellen, Zellgruppen, Schnitt komplett mit Zellen ausgefüllt?)
- Zellerhaltung/ Morphologie (Darstellung der Zellmembranen und des Zytoplasmas, Faltenbildung im Zellschnitt, Messerscharten?)
- Wirkung des Kontrastmittels (Kontrast, Detailerkennbarkeit, Kristalle, weitere Artefakte?)
- Ergebnis der Immunogoldmarkierung (Verhältnis der Markierung von Negativkontrollen zu Positivkontrollen, Artefaktbildung durch Goldkonglomerate?)
- Im Falle einer unbefriedigenden Qualität der Präparate wurde die Beurteilung abgebrochen und der Versuch ab der kritischen Stelle wiederholt.

Als Kriterien für die Identifizierung von Pestivirionen wurden folgende Punkte beachtet:

- Durchmesser 40 bis 60 nm (Schwankungen kamen durch Präparation zustande)
- annähernd runder oder hexagonaler Umriss
- Differenzierung von Virushülle (feine Umrisslinie, nur einfache Lipidmembran sichtbar) und dunkel kontrastiertem Kapsid

Diese Kriterien wurden anhand von Fotos von Pestivirionen in Dünnschnitten aus hausinternen Vorarbeiten und aus der Literatur (*Gray und Nettleton, 1987; Weiland, F. et al., 1999*) entwickelt. Abb. 8 zeigt extrazelluläre Pestivirionen nach Epoxidharz- und Gefriereinbettung.

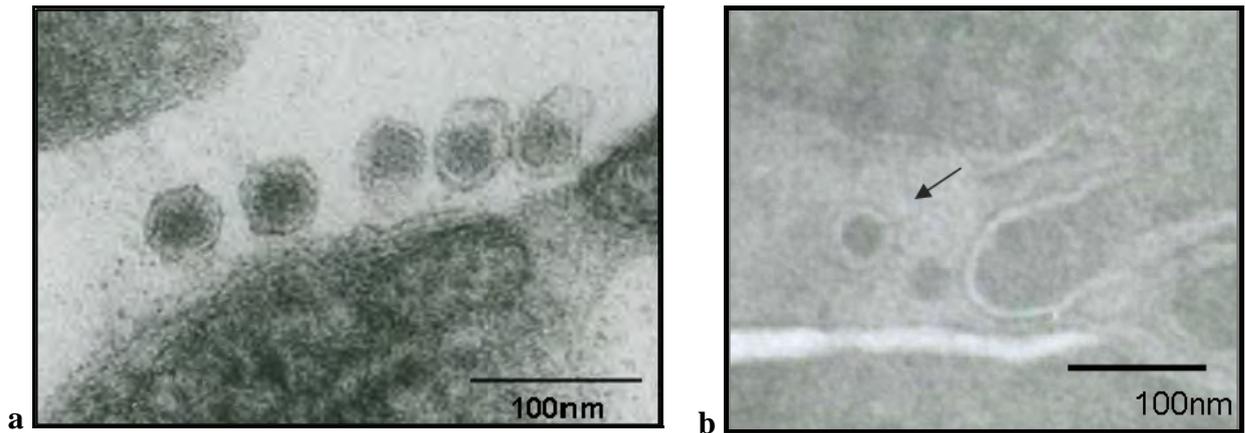


Abb. 8: Extrazelluläre Pestivirionen nach Epoxidharz- (a) und Gefriereinbettung (b).
Beide Fotos stammen aus der vorliegenden Arbeit.

3.2.12 Fotodokumentation und –bearbeitung

Von ausgewählten Bereichen der beurteilten Präparate wurden Bilder mit einer Belichtungszeit von 0,8- 1,2 s in Form von klassischen Negativaufnahmen (ISO163 Planfilm) angefertigt. Diese wurden durch Belüftung des Kameraraumes dem Elektronenmikroskop entnommen und in einer Dunkelkammer entwickelt:

- 3-4 min Entwickler (D19, Fa. Kodak)
- 1 min Wasserbad
- 8-10 min Fixierer (Dokumol, Fa. Tetenal; 1:5 in H₂O)
- 8-10 min Wasserbad
- 1x in Agepon (Fa. Agfa, 1:200 in H₂O) getaucht
- 30 min Trockenschrank.

Im Anschluss wurden die Negative entweder in einem Negativscanner (Fa. hp) in digitale Positive umgewandelt oder es wurden Abzüge auf Fotopapier (Ilfospeed RC Deluxe) mit einem Präzisionsfachvergrößerer (Laborator 138S) in einer Dunkelkammer angefertigt:

- Papier: Kategorie 1 (weich-Konturen) – 5 (hart-Kontrast)
- Belichtungszeit: 0,5 – 5 s (Schwärzung ansteigend)
- Blendeneinstellung: 5,6/ 8/ 11/ 16 (Schwärzung abfallend)

Nach der Belichtung wurde der Abzug bis zum Erscheinen des Bildes in Entwicklerlösung (PQ Universal, 1:10 in H₂O) geschwenkt, und im Anschluss 1 min im Wasserbad getaucht, 2-5 min im Fixierbad (Rapid Fixer, 1:10 in H₂O) gelagert und anschließend luftgetrocknet. Zur weiteren Verwendung der Abzüge wurden diese ebenfalls mithilfe eines Scanners digitalisiert.

4 Ergebnisse

In dieser Arbeit sollte der Morphogeneseprozess von Pestiviren in infizierten Kulturzellen mit ultrahistologischen Verfahren untersucht werden. Hierzu wurden in Vorversuchen zunächst Infektionsmodelle verschiedener Pestiviren durch Erstellung von Wachstumskurven charakterisiert. Die Ergebnisse zu diesem ersten Teil der Arbeit werden in Kapitel 4.1 vorgestellt. Basierend auf den Ergebnissen wurden pestivirusinfizierte Kulturzellen ultrahistologisch mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie untersucht (Kap. 4.2). Im Anschluss erfolgte der immunelektronenmikroskopische Nachweis mit im Institut verfügbaren Antikörpern, um die genaue zelluläre Lokalisation viraler Proteine zu untersuchen. Kapitel 4.3 beinhaltet alle Ergebnisse zur Auswahl und zum Einsatz antigenerhaltender Einbettungsverfahren (Einbettung in Acrylharz, Gefriereinbettung). Zur Etablierung dienten vor allem Zellkulturmodelle, in denen eine hohe Virusantigenkonzentration vorlag (Baculovirus-Expressionssystem, Tet-on Expressionssystem, Tollwutvirusinfektion von BHK-21 Zellen). Schließlich wurde die Gefriereinbettung nach TOKUYASU ausgewählt, und es gelang mit dieser Technik erstmals der immunelektronenmikroskopische Nachweis verschiedener Pestivirus-Strukturproteine in infizierten Kulturzellen.

4.1 Auswahl geeigneter Infektionsmodelle (Vorversuche)

4.1.1 Auswahl und Herstellung geeigneter Virusstocks verschiedener Pestiviren

Am Beginn der Arbeit stand die Auswahl geeigneter Infektionsmodelle für die geplanten ultrahistologischen Untersuchungen. Hierzu wurde auf verschiedene im Institut etablierte Virus-/ Zellsysteme zurückgegriffen. Es wurden Pestivirus-Stämme bevorzugt, die vergleichsweise hohe Virustiter nach Anzucht in der Zellkultur erreichten. Auf diese Weise sollten optimale Ausgangsbedingungen für die ultrahistologischen Untersuchungen geschaffen werden. Tab. 4 zeigt eine Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Viren sowie die Virustiter der angelegten Virusstocks berechnet nach Endpunkttitration.

Tab. 4: Für Infektions-, Morphologie- und Immunhistologiestudien ausgewählte Pestiviren.

Die Virustiter wurden durch Endpunkttitration ermittelt. TCID₅₀ = Tissue culture infectious dose 50, zp = zytopathogener Biotyp, nzp = nicht zytopathogener Biotyp

Ausgewähltes Virus	Virustiter TCID ₅₀ /ml	Zellart	Bio- typ	Verwendung in dieser Arbeit		
				Infektions- studien	Morphologie- studien	Immun- histologie- studien
BVDV-1 „NADL“	3,5 x 10 ⁷	MDBK	zp	x	x	-
BVDV-2 „890“	3,5 x 10 ⁷	MDBK	nzp	x	x	x
„Giraffe-1“	4,5 x 10 ⁷	MDBK	zp	x	x	x
KSPV „Alfort-Tüb“	5,8 x 10 ⁶	PK-15	nzp	-	-	x
KSPV „Alfort-Tüb-JIV“ (BVDV „cp-7“ JIV-Insertion)	8,7 x 10 ⁶	SK-6	zp	-	-	x

4.1.2 Erstellung von Virusvermehrungskinetiken

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Vorarbeiten zu den elektronenmikroskopischen Untersuchungen beschrieben. Hier wurde zunächst das Augenmerk darauf gelegt, einen geeigneten Zeitraum nach der Infektion der Zellen zu definieren, in dem die Virusmorphogenese beginnt und erstmals neu entstandene Virionen in ausreichender Zahl in den infizierten Zellen nachgewiesen werden können. Hierzu wurden Kulturzellen infiziert bzw. transfiziert; in kurzen Zeitabständen erfolgte die quantitative Bestimmung der viralen RNS in den Zellen als Maß für den Verlauf der Genomreplikation sowie die Bestimmung des Virustiters im Überstand als Maß für freigesetzte infektiöse Viren. Die Infektions-/Transfektionsversuche konzentrierten sich auf die initiale Virusfreisetzung nach der Infektion, d. h. den ersten Vermehrungszyklus nach Virusinokulation/ Transfektion. Daher wurden die Messzeitpunkte in engen Zeitabständen von 2-4 h innerhalb der ersten 24-30 h der Infektion gewählt. Im Anschluss konnte aufgrund der Ergebnisse ein Zeitfenster für die elektronenmikroskopische Untersuchung festgelegt werden.

4.1.2.1 Infektionsmodelle

Zur Erstellung von Wachstumskurven und zur RNS-Quantifizierung sollten die eingesetzten Zellen möglichst alle zeitgleich infiziert werden. Daher wurde auf eine Synchronisation der Infektion (Adhäsionsphase 1 h bei 4 °C) sowie auf eine hohe Infektionsdosis (m. o. i. ≥ 1) Wert gelegt. Im Anschluss an die Inokulationszeit (1 h bei 37 °C) wurden die infizierten Zellen in Minischalen ausgesät, so dass zu jedem Messzeitpunkt der Überstand einer Schale zur Endpunkttitration sowie der Zellrasen zur Quantifizierung der enthaltenen viralen RNS zur Verfügung stand. Bei den zytopathogenen Pestivirusstämmen konnte im Laufe der Infektion die Ausbildung eines typischen zpE beobachtet werden (s. Abb. 9).

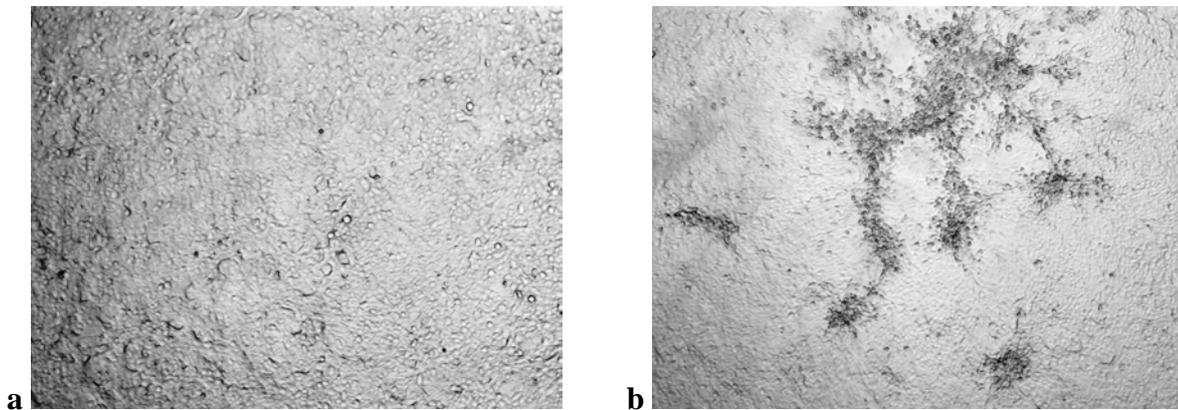


Abb. 9: Pestivirusinduzierter zpE auf MDBK-Zellen.

a) Nicht infizierter intakter Zellrasen. **b)** Pestivirusinduzierter zpE des Zellrasens mit Schrumpfung, Spindelform und Absterben infizierter Zellen.

4.1.2.2 Transfektionsmodelle

Ein weiterer Ansatz, der eine Synchronisation der Virusreplikation in Zellkultur ermöglicht, ist die Transfektion von replikationskompetenter Virus-RNS mittels Elektroporation. Vorteile der Transfektion liegen zum einen in der exakten Synchronisation des Infektionszeitpunktes, zum anderen werden bei anschließenden ultrahistologischen Studien nur neu entstandene Viruspartikel detektiert. Hierfür wurde der infektiöse Klon des BVDV-1-Stammes „cp7“ (cp7-388) mittels Elektroporation in MDBK Zellen transfiziert. Nach Transkription der c-DNS zu infektiöser RNS wurde eine Transfektionsdosis von ca. 1,3 μg RNS pro großer Schale MDBK-Zellen (ca. 3×10^7 Zellen/ Schale) in den Versuchen eingesetzt.

Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurde ein indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT) zum Nachweis des Pestivirus-Nicht-Strukturproteins NS3 durchgeführt.

NS3 konnte 10-12 h nach der Transfektion in 80 % der adherenten Zellen nachgewiesen werden. Die Ausbildung eines pestivirustypischen zpE wurde frühestens 16 h p. t. beobachtet.

4.1.2.3 Erstellung von Wachstumskurven zur Untersuchung der initialen Virusvermehrung

Der Virustiter der zellfreien Zellkulturüberstände aus den Infektions-/ Transfektionsversuchen wurde durch Endpunkttitration auf permissiven Zellen und Berechnung nach SPEARMAN und KÄRBER als TCID₅₀/ml ermittelt. Auf dieser Grundlage wurden für jede Virus-/ Zellkombination zunächst Ein-Schritt-Wachstumskurven über einen relativ weiten Zeitrahmen (0 h bis 24-30 h p. i.) erstellt (Abb. 10 a, c, e und Abb. 11a). Im Anschluss wurde eine zweite Wachstumskurve mit engerem oder verschobenem Zeitrahmen für den zuvor ermittelten Zeitraum der initialen Virusfreisetzung erstellt (Abb. 10 b, d, f und Abb. 11b). Nur die infizierten/ transfizierten Zellen der zweiten Wachstumskurven wurden für die quantitative real time RT-PCR verwendet.

Bei Betrachtung der Wachstumskurven nach Infektion fällt auf, dass zum Zeitpunkt „0“ nach Infektion bereits ein Virustiter von bis zu 10⁴ TCID₅₀/ml gemessen wurde. Hierbei handelt es sich um Virus, das nach der Inokulation durch Waschen nicht entfernt werden konnte.

Das Auftreten eines zpE als Folge der Virusreplikation der zytopathogenen Isolate stellte eine zeitliche Begrenzung für die geplanten elektronenmikroskopischen Studien dar, da die Zellmorphologie möglichst unbeeinträchtigt sein sollte.

Die Wachstumskurven von **BVDV-1** „NADL“ (Abb. 10 a und b) zeigen, dass der initiale Virustiteranstieg im Überstand bereits zwischen 6 und 12 h p. i. stattfand. Ein zpE trat erst ab 16 h p. i. auf.

Im Vergleich dazu fand die Virusfreisetzung bei **BVDV-2** „890“ etwas später statt. Abb. 10 c und d zeigen den initialen Virustiteranstieg in einem Zeitraum von 8 bis 16 h p. i.. Ein zpE wurde im Lauf der Infektion nicht beobachtet.

Bei Betrachtung der Wachstumskurven vom **Pestivirus** „Giraffe-1“ ist anzumerken, dass neben einem initialen Titeranstieg 8 bis 16 h p. i. ein zweiter Anstieg nach 20 h p. i. im gewählten Untersuchungszeitraum festgestellt werden konnte. Ab 16 h. p. i. wurde ein massiver zpE beobachtet.

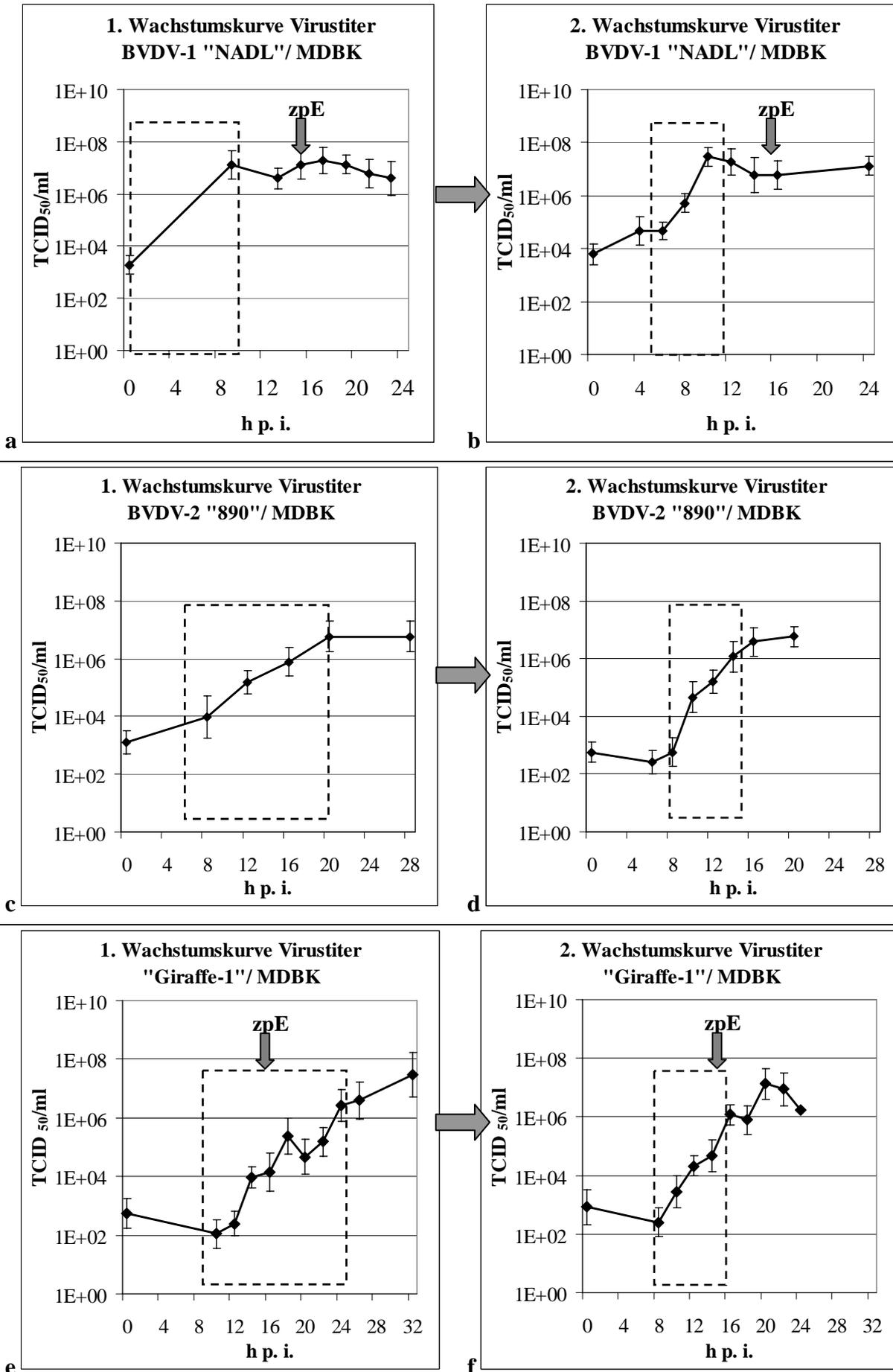
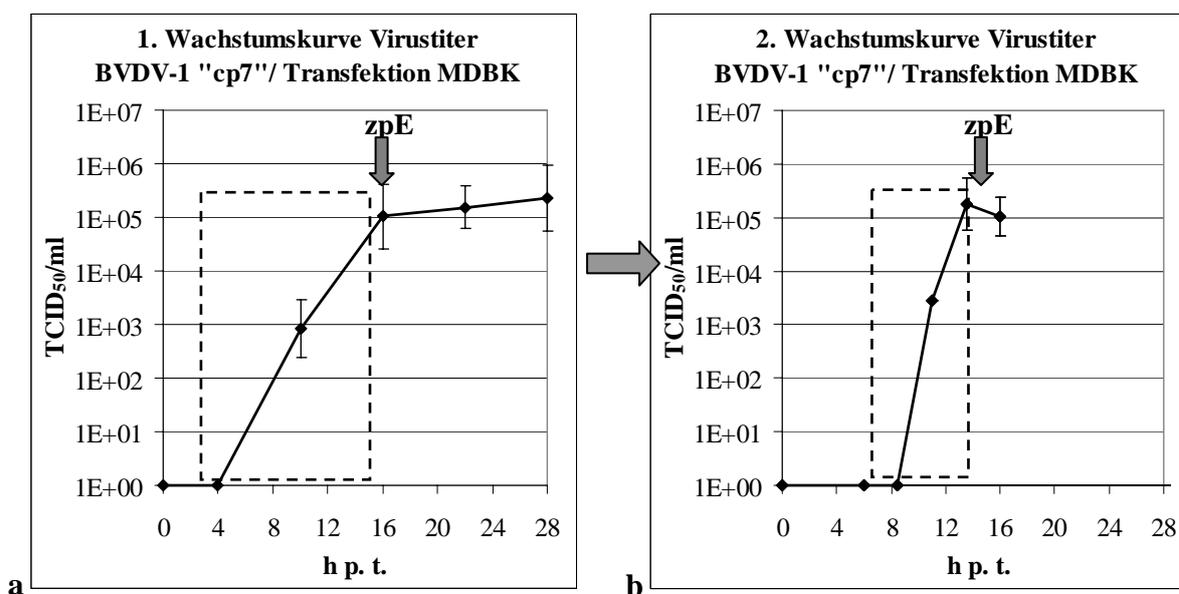


Abb. 10: Wachstumskurven nach Infektion von MDBK Zellen.

Die Infektion erfolgte jeweils mit einer m. o. i. von 10. Der Virustiter wurde durch Endpunkttitration der Zellkulturüberstände bestimmt. zpE = Erstmaliges Auftreten eines zpE bei lichtmikroskopischer Betrachtung des Zellrasens. gestrichelter Kasten = identifizierter Zeitraum für initialen Anstieg. Die Zeitpunkte für die Wachstumskurven auf der rechten Seite wurden basierend auf den Ergebnissen der Wachstumskurven auf der linken Seite gewählt. **a) und b):** BVDV 1 „NADL“. **c) und d):** BVDV-2 „890“. **e) und f):** „Giraffe-1“.

Die Wachstumskurven für **BVDV-1 „cp7“** (Abb. 11 a und b) nach Transfektion von MDBK Zellen zeigten eine initiale Virusfreisetzung in einem Zeitraum von 8 h und 13 h p. t.. Ein Virustiter im Überstand der Zellen war zu frühen Zeitpunkten im Gegensatz zu den Infektionsstudien nicht nachweisbar, da bei der Transfektion nicht mit infektiösem Virus, sondern lediglich mit replikationskompetenter RNS gearbeitet wurde. Ein zpE wurde ab 16 h p. t. beobachtet.

**Abb. 11: Wachstumskurven nach Transfektion von MDBK Zellen.**

Ca. 3×10^7 Zellen wurden mit 1,3 μg infektiöser RNS transfiziert. Der Virustiter wurde durch Endpunkttitration des Zellkulturüberstandes bestimmt. zpE = Erstmaliges Auftreten eines zpE bei lichtmikroskopischer Betrachtung des Zellrasens. gestrichelter Kasten = Zeitraum für initialen Anstieg. Die Zeitpunkte für die Wachstumskurve auf der rechten Seite wurden basierend auf den Ergebnissen der Wachstumskurve auf der linken Seite gewählt.

4.1.2.4 Quantitative real time PCR zum Nachweis der Virusreplikation

Eine quantitative Bestimmung von pestiviraler RNS wurde an den einzelnen Messzeitpunkten aus den infizierten Zellen mittels real time PCR durchgeführt. Bei dieser Methode werden Amplifikate zum Zeitpunkt ihrer Entstehung während der PCR quantifiziert, im Gegensatz zum Nachweis von akkumulierten Amplifikaten bei der herkömmlichen „Endpunkt“-PCR. In dieser Arbeit wurde eine TaqMan real time PCR verwendet, die nach dem Prinzip des „Fluorescence resonance energy transfer“ (FRET) funktioniert (siehe Abb. 12). Im Bereich des durch die Primer festgelegten amplifizierten Sequenzabschnittes bindet eine Sonde („Probe“), die mit zwei Farbstoffen, einem fluoreszierender Reporter (Donor) und einem Quencher (Akzeptor) gekoppelt ist. Wenn beide Farbstoffe an der Sonde gebunden sind, wird die Anregungsenergie des Reporters auf den Quencher übertragen. Bei jedem Vermehrungszyklus während der Elongation spaltet die DNS-Polymerase die Sonde ab, so dass der Reporterfarbstoff freigesetzt wird und die Fluoreszenz des Reporters nicht mehr abgeschwächt wird. Bei der Fluoreszenzmessung gibt der C_T -Wert an, bei welchem Zyklus (C) das Fluoreszenzsignal einen gesetzten Schwellenwert (Threshold) überschritten hat.

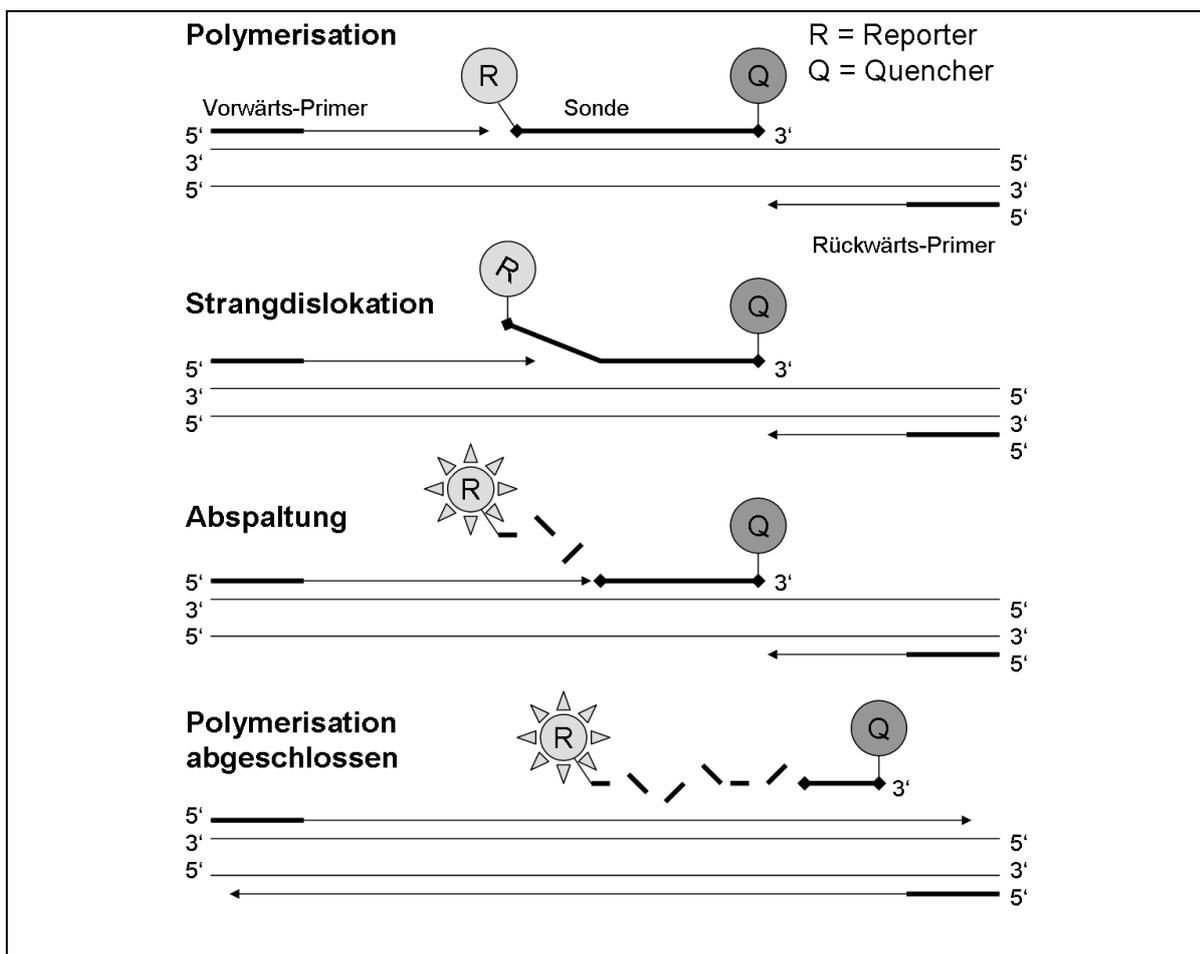


Abb. 12: Prinzip der FRET Signalentstehung.

Zeichnung nach: Applied Biosystems SDS Trainings.

Für die Auswertung und Quantifizierung der PCR Produkte standen verschiedene Modi zur Auswahl. Es wird unterschieden zwischen absoluter und relativer Quantifizierung. Zur absoluten Quantifizierung, d.h. zur Bestimmung der Nukleinsäure-Kopienzahl in einer Probe muss vor der eigentlichen Analyse eine Standardprobe präpariert werden. Hierfür eignen sich DNS-Plasmide oder in vitro transkribierte RNS, deren Konzentration bzw. Kopienzahl sich durch OD-Messung bestimmen lässt. Aus dem Standard wird eine Verdünnungsreihe zur Erstellung einer Standardkurve erzeugt. Die Kopienzahlen der untersuchten Proben können im Anschluss an die PCR über die ermittelten C_T -Werte anhand der Standardkurve berechnet werden.

Für die vorliegende Arbeit war die genaue Kopienzahl nicht von Bedeutung, vielmehr interessierte der Vergleich der Menge an viraler RNS zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion. Daher wurde die relative Quantifizierung gewählt, die von der an den Thermocycler angeschlossenen Software (ABI Prism 7000 Sequence Detection System 1.1) nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode berechnet wurde. Dieses Verfahren erlaubt die relative Bestimmung der Nukleinsäuremengen in den eingesetzten Proben in Relation zu einem Kalibrator-Wert. Als Kalibrator-Wert kann z. B. eine Probe zum Zeitpunkt 0 nach Infektion eingesetzt werden. Der Kalibratorwert wird gleich 1 gesetzt und die Werte der anderen Proben als die x-fache Nukleinsäure-Menge im Vergleich zum Kalibrator ausgedrückt. Somit ist ein Vergleich zwischen unterschiedlichen Proben ohne die Kenntnis der Kopienzahl eines Standards sowie ohne die Erstellung einer Standardkurve möglich.

Zur relativen Quantifizierung muss eine interne Kontrolle („housekeeping gene“) eingesetzt werden. Um absolute Schwankungen der Ziel-Nukleinsäure hinsichtlich Menge und Qualität zu relativieren, eignet sich u. a. der Nachweis von zellulären Genen bzw. mRNS, die in allen Zellen konstant in gleicher Menge exprimiert wird. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Abschnitt der ribosomalen 18s-RNS als interne Kontrolle ausgewählt (*Giulietti et al., 2001; Pfaffl, 2001*). Es handelt sich dabei um nichtkodierende RNS, die in eukaryotischen Zellen in konstanter Konzentration vorliegt. Sie trägt keine genetische Information, die in Proteine umgeschrieben wird, sondern ist zusammen mit den ribosomalen Proteinen am Aufbau und der enzymatischen Aktivität des Ribosoms und damit an der Proteinsynthese beteiligt.

Der relativen Quantifizierung nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode liegt folgende Formel zugrunde, welche die Menge an Ziel-DNS, normalisiert gegen die interne Kontrolle und relativ zu einer Kalibrator-Probe, ausdrückt:

$$x = 2^{\Delta\Delta C_T}$$

$$\begin{aligned}\Delta\Delta C_T &= \Delta C_T \text{ Probe} - \Delta C_T \text{ Kalibratorprobe} \\ &= (C_{T\text{Ziel-NS Probe}} - C_{T\text{interne Kontrolle}}) - (C_{T\text{Ziel-NS-Kalibrator}} - C_{T\text{interne Kontrolle}})\end{aligned}$$

(*Applied Biosystems, 2001; Giulietti et al., 2001; Pfaffl, 2001*)

Um den Versuchsansatz zur relativen Quantifizierung von pestiviraler Nukleinsäure durchzuführen, musste zunächst ein Vergleich der 18s-RNS-PCR und der Pestivirus-PCRs durchgeführt werden. Hiermit sollte gezeigt werden, dass die Effizienz (Verdopplung aller Amplifikate pro Zyklus) für die beiden PCRs ausreichend und vergleichbar ist.

4.1.2.4.1 Validierung der quantitativen real time PCR

Bevor die relative Quantifizierung nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode angewendet werden kann, muss zur Validierung einer gewählten Kombination von Ziel-Nukleinsäure (NS) und interner Kontrolle für beide PCR Protokolle eine real time PCR im Modus absolute Quantifizierung durchgeführt werden, um zu zeigen, dass die beiden PCRs eine ausreichende Effizienz (E) aufweisen. Bei der Validierung wurde eine Probe eingesetzt, welche die nachzuweisende Zielsequenz in ausreichender Menge enthielt, damit sich eine Verdünnungsreihe (z. B. 1:10 über mind. 4 Stufen) zur Erstellung einer Standardkurve anlegen ließ. Bei der grafischen Darstellung werden auf der x-Achse die gewählten Verdünnungsstufen und auf der y-Achse die C_T -Werte der jeweiligen Probe aufgetragen (siehe Abb. 13). Der C_T -Wert gibt an, bei welchem Zyklus das Fluoreszenzsignal den gesetzten Schwellenwert (Threshold) überschritten hat. Durch lineare Regression ergibt sich aus der in der Geradengleichung angegebenen Steigung (m) die Effizienz (E) der PCR (*Pfaffl, 2001*):

$$E = 10^{-1/m}$$

Der Idealwert ist für $m = -3,33$, somit für $E = 2$ und entspricht einer Verdopplung der NS-Menge innerhalb eines jeden PCR-Zyklus. Es muss mindestens eine Effizienz $E \geq 1,8$ erreicht werden (*Ginzinger, 2002*).

Weiterhin sollte durch den Vergleich der Steigung der Standardkurven gezeigt werden, dass die PCRs nicht nur eine ausreichende, sondern auch eine ähnliche Effizienz aufweisen. Hierzu wird die Differenz der Steigungen (Δm) der beiden Standardkurven berechnet. Eine Validierung erfolgt bei $\Delta m \leq 0,1$ (*Applied Biosystems, 2001*).

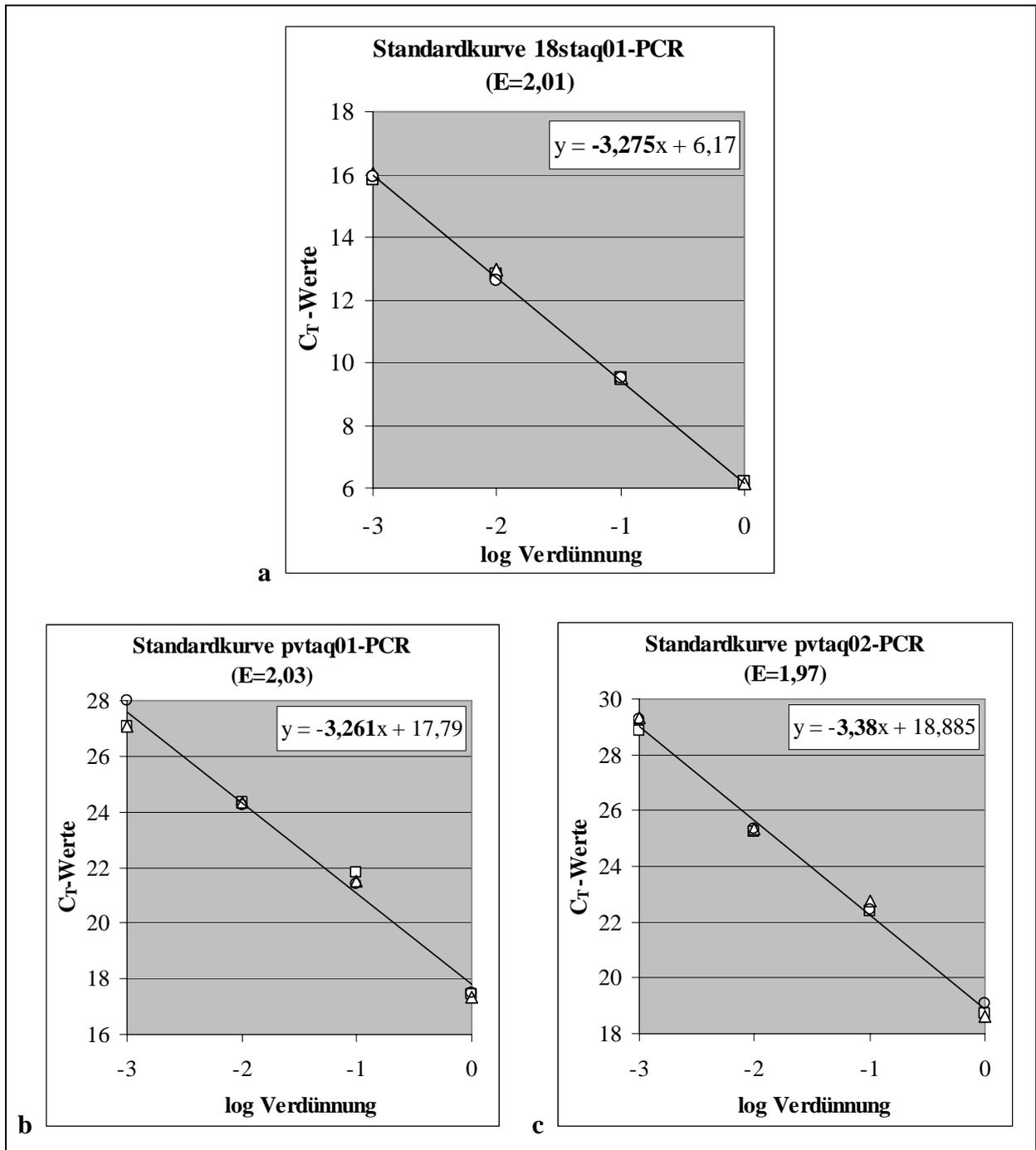


Abb. 13: Validierung zur relativen Quantifizierung.

Standardkurven erstellt anhand der C_T-Werte (Triplikate) gegen die entsprechende Verdünnungsstufe. Die Steigung m der Standardkurve wird in der Gleichung $y = mx + b$ in der Grafik dargestellt. Die Effizienz E errechnet sich daraus über die Formel $E = 10^{-1/m}$. Für alle Ansätze wird eine ausreichende Effizienz ($\geq 1,8$) und eine Steigungsdifferenz $\Delta m \leq 0,1$ berechnet.

In Tab. 5 sind die verwendeten PCRs sowie ihre Validierung für den Einsatz zur relativen Quantifizierung zusammengestellt. Es wurde gezeigt, dass die ausgewählten Primer/Sondenkombinationen für die Durchführung einer relativen Quantifizierung nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode geeignet sind.

Eine Validierung zur Effizienz der reversen Transkription wurde nicht durchgeführt. Es wurde angenommen, dass sie bei den Ansätzen gleich ist.

Tab. 5: Ergebnisse der real time PCR Validierung für die relative Quantifizierung.

Sonde	Ziel-DNS	Effizienz ($E_{\max} = 2$) (Validierung $\geq 1,8$)	$\Delta_{\text{mZiel-DNS-PCR/m18sPCR}}$ (Validierung $\leq 0,1$)
18staq01	18s (Ribosomale RNS)	2,01	-
pvtaq01	BVDV-1 „cp7“ u. „NADL“	2,03	0,014
pvtaq02	BVDV-2 „890“, „Giraffe-1“	1,97	-0,105

4.1.2.4.2 Relative Quantifizierung der Pestivirus RNS aus den Infektionsversuchen

RNS aus infizierten MDBK Zellen aus den Infektions- bzw. Transfektionsstudien (Kap. 4.1.2.1 und 4.1.2.2) wurde für die real time PCR präpariert. Da die genaue Kopienzahl der Nukleinsäure für die vorliegende Arbeit nicht von Bedeutung war, sondern lediglich der Vergleich zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion, wurde die relative Quantifizierung nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode mit 18s-RNS als interne Kontrolle angewendet. Nach erfolgreicher Validierung der PCR Effizienzen (Kap. 4.1.2.4.1) konnte die relative Quantifizierung für alle Infektionsstudien eingesetzt werden. Die Formelberechnung und die Auswertung in Form von Balkendiagrammen erfolgte automatisch durch die Geräte-Software nach der Einspeisung der Daten aus einer durchgeführten real time PCR. Der Kalibrator-Wert wurde in den dargestellten Grafiken (Abb. 14) stets der Probe „0 h p. i./ p. t.“ zugeordnet. Die Werte der anderen Proben wurden als die x-fache NS-Menge im Vergleich zum Kalilbrator ausgedrückt.

Die Balkendiagramme in Abb. 14 zeigen die initiale Phase der viralen NS-Zunahme und somit der viralen Replikation in den infizierten/ transfizierten Zellen. Bei den Infektionsmodellen beginnt diese bereits 6 h nach der Infektion, während bei dem Transfektionsmodell für BVDV-1 „cp7“ ein Wert > 1 erst zum Zeitpunkt 11 h p. t. zu erkennen ist.

Die relative NS- Menge erreicht bei den Infektionsmodellen nach wenigen Stunden einen Plateauwert, „NADL“ erreicht 14 h p. i. die ca. 30fache NS-Menge, „890“ erreicht bereits 8 h p. i. die ca. 50fache NS-Menge und „Giraffe-1“ erreicht 14 h p. i. die ca. 100fache NS-Menge im Vergleich zum Kalibratorwert 0 h p. i.. Im Transfektionsmodell für „cp7“ wird bis zum letzten Messzeitpunkt (16 h p. t.) kein Plateauwert erreicht, zu diesem Zeitpunkt wurde die ca. 15fache NS-Menge zum Kalibratorwert gemessen.

Bei „NADL“ und „cp7“ traten zu den frühen Messzeitpunkten (4 h p. i. und 6 h p. t.) Werte von <1 auf (Abb. 14 a und d). Dieses Phänomen kann durch RNS-Degradation nach der Infektion vor Beginn der effektiven Genomreplikation bedingt sein.

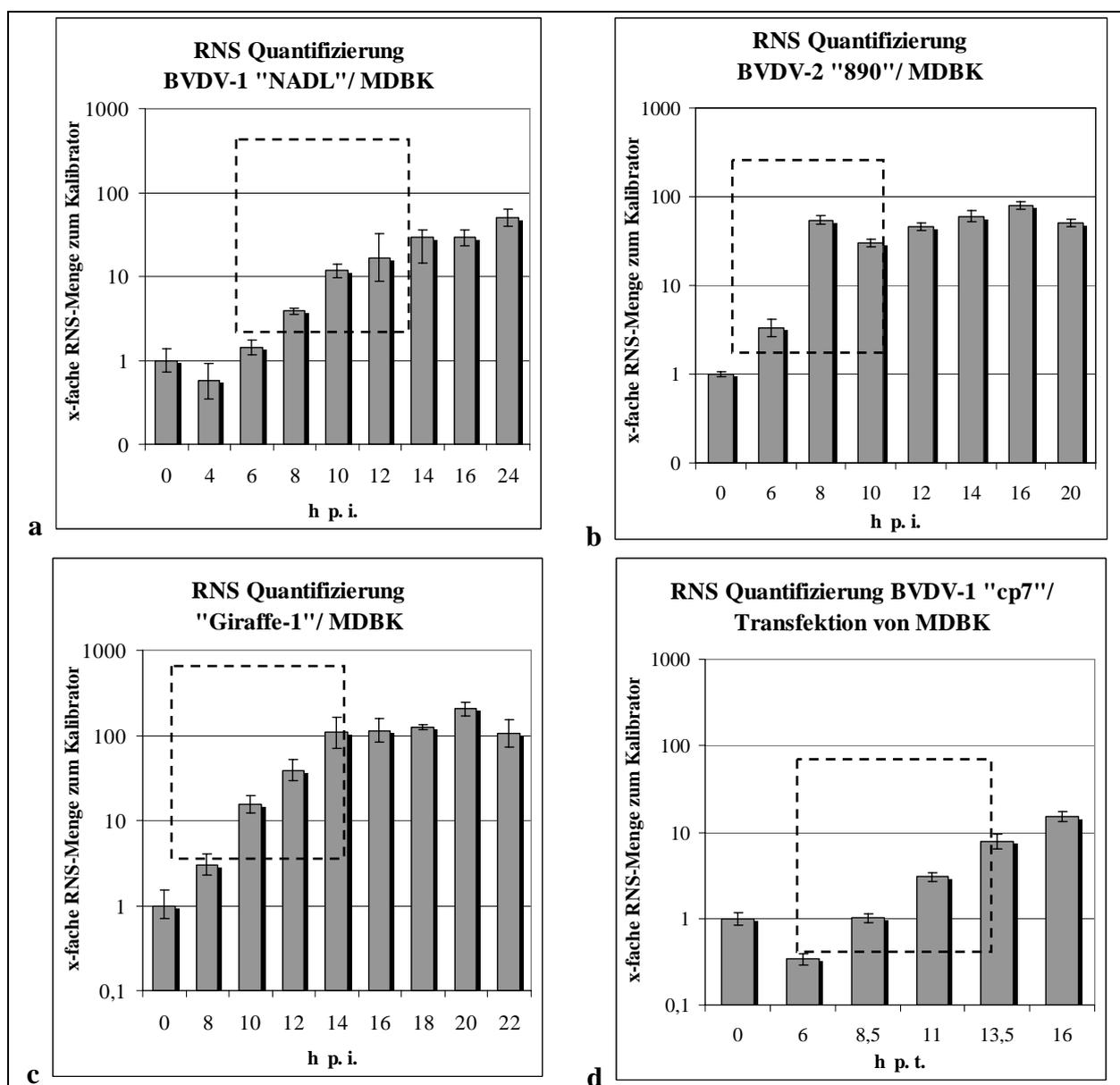


Abb. 14: Grafische Darstellung der relativen Quantifizierung nach real time PCR.

Die relative NS-Menge wurde durch relative Quantifizierung nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode (real time PCR) bestimmt. Kalibrator = Wert, mit dem alle anderen Werte verglichen werden und der =1 gesetzt wird. Kalibrator in diesen Balkendiagrammen: „0 h p. i./ p. t.“. Gestrichelter Kasten = Zeitraum für initialen Anstieg.

4.1.3 Erarbeitung der Infektionsmodelle für ultrahistologische Untersuchungen

Ziel der Infektions- bzw. Transfektionsstudien war es, durch Virustiterbestimmung im Zellkulturüberstand und durch Quantifizierung viraler NS aus Zellen den Zeitraum für die Morphogenese und Ausschleusung von verschiedenen Pestiviren zu bestimmen, um im Anschluss gezielt ultrahistologische Untersuchungen an eingebetteten Zellen durchführen zu können. Bei jedem Infektionsmodell wurde darauf geachtet, ein Untersuchungszeitfenster innerhalb des Zeitraums des initialen Virustiteranstiegs bzw. der initialen Virusreplikation auszuwählen. Die Ergebnisse aus den Wachstumskurven decken sich mit den jeweiligen quantitativen NS-Messungen insofern, als dass der Anstieg von viraler RNS in der infizierten/transfizierten Zelle vor oder zeitgleich zum Auftreten von infektiösem Virus im Zellkulturüberstand gemessen wurde.

Zum besseren Überblick über die Vorversuche sind in Tab. 6 die Ergebnisse der Wachstumskurven und der NS-Quantifizierungen zusammengefasst. Die in der Folge ausgewählten Zeitpunkte zur Einbettung und ultrahistologischen Untersuchung von Zellen sind angegeben.

Tab. 6: Zusammenfassung der Untersuchungen zur Infektionskinetik.

Pestivirus	initialer Virus-titeranstieg im Kulturüberstand	initialer Virus-RNS-Anstieg in Zellen	Auftreten eines zpE	gewählter Zeitpunkt für ultrahistologische Studien
BVDV-1 „NADL“	6-12 h p. i.	6-14 h p. i.	ab 16 h p. i.	10 h p. i.
BVDV-2 „890“	10-16 h p. i.	6-10 h p. i.	-	10, 14 und 16 h p. i.
„Giraffe-1“	10-16 h p. i.	8-14 h p. i.	ab 16 h p. i.	12, 13 und 15 h p. i.
BVDV-1 „cp7“	8-13 h p. t.	8-16 h p. t.	ab 16 h p. t.	10 und 12 h p. t.

Bei den folgenden Infektionen für die ultrahistologischen Untersuchungen wurde das Prinzip der Infektionssynchronisation (Adhäsionsphase 1 h bei 4 °C) sowie der hohen Infektionsdosis (m. o. i. ≥ 1) fortgeführt. Im Unterschied zu den Kinetikstudien wurde die Virussuspension nach einer Inokulationsphase von 2 h nicht abgenommen, sondern lediglich mit frischem Medium aufgefüllt.

4.2 Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Darstellung von Viruspartikeln (Ultrahistologie)

4.2.1 Probenpräparation

Zur Anfertigung von Ultradünnschnitten aus Monolayer-Zellkulturen wurden drei verschiedene Techniken zur Einbettung in Epoxidharze angewandt:

- Blockeinbettung: Zellanschnitt ungerichtet,
- Flacheinbettung Monolayer: Zellanschnitt horizontal und
- Flacheinbettung doppelter Monolayer „Sandwich-Methode“: Zellanschnitt vertikal.

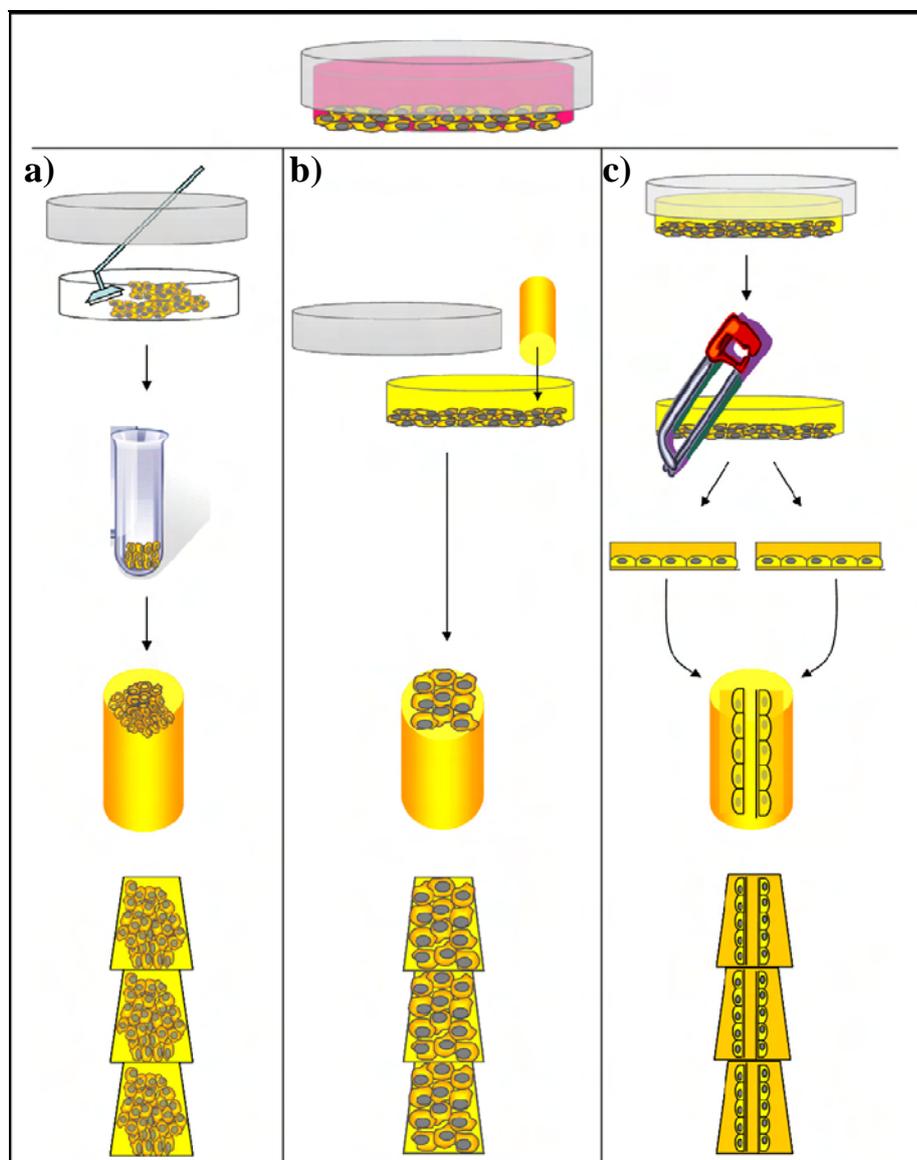


Abb. 15: Verschiedene Präparationsmethoden von Monolayerzellen aus einer Kulturschale.

a) Blockeinbettung, Zellanschnitt ungerichtet. b) Direkte Monolayer Flacheinbettung, Zellanschnitt horizontal. c) Flacheinbettung doppelter Monolayer „Sandwich-Methode“, Zellanschnitt vertikal.

zu a) Die Blockeinbettung beinhaltet das mechanische (Zellschaber) oder enzymatische (durch Trypsin-EDTA) Ablösen des Zellrasens von der Kulturschale und die Herstellung eines Zellpellets durch Zentrifugation. Die Herstellung eines Zellpellets aus mechanisch abgelösten Zellen gelang nicht, so dass die weitere Präparation ausschließlich mit trypsinierten Zellen durchgeführt wurde. Aus dem fixierten Zellpellet wurden nach Stabilisierung in Agar kleine Zellblöcke herausgeschnitten und in Epoxidharz eingebettet. Die Dünnschnitte, die aus dem polymerisierten Epoxid-Block angefertigt wurden, enthielten Zellen in loser Anordnung und in ungerichteter Anschnittebene. Die Zelldichte pro Schnitt war starken Schwankungen unterworfen und direkt abhängig von der Zelldichte im agarstabilisierten Zellpellet. Außerdem beeinflusste die Zelldichte pro Schnitt die Schneidbarkeit des Probenblockes. Anhand der Dünnschnitte konnte eine Orientierung durch die Identifizierung von Apikal-/ Basalmembran angeschnittener Zellen nicht vorgenommen werden.

zu b) Eine weitere Methode war die Flacheinbettung eines Zellmonolayers, die einen horizontalen Schnitt durch die Zellen erlaubte. Hierbei erfolgte die Fixierung der Zellen im Zellverbund, und vor der Polymerisation des Epoxid-Harzes wurden Zylinder aus Gelatine-Kapseln auf den Zellrasen gestellt und mit Epoxid-Harz befüllt. Nach der Polymerisation wurden die ausgehärteten Zylinder mechanisch von der Kulturschale abgelöst. An ihrem unteren Ende befand sich nun ein Monolayer aus eingebetteten Zellen, so dass nach dem Zutrimmen eine Schnittfläche der Zellen im horizontalen Anschnitt entstand. Die Anzahl der Dünnschnitte war begrenzt auf die „Dicke“ des Zellmonolayers, so dass eine exakte Ausrichtung der Probe zum Schneidmesser notwendig war, um eine optimale Ausbeute an Dünnschnitten zu erreichen.

zu c) Die Flacheinbettung von doppelten Monolayern, die sogenannte „Sandwich“-Methode, wurde ebenfalls eingesetzt. Durch die zweifache Polymerisation dauerte die Präparation von Dünnschnitten 2 Tage länger. Bei dieser Methode wurden die Zellen im Präparat vertikal angeschnitten und ließen sich im Zellverbund beurteilen. Hierbei konnte von jedem Präparat eine unbegrenzte Anzahl von Schnitten hergestellt werden.

Während der Präparation von Zellschnitten in Epoxidharzen traten beim Schneiden der Blöcke gelegentlich folgende Phänomene auf:

- unterschiedliche Schnittdicke, abweichend von angestrebter silberfarbener Interferenz; hierbei sehr dicke Schnitte (kupferfarben) alternierend mit sehr dünnen Schnitten (grau),
- fehlende Bildung von Schnittbändern,
- Herabziehen des gerade gewonnenen Schnittes an der Rückseite der Messerschneide und Benetzen des Präparateblocks anstatt Aufschwimmen des Schnittes auf der Wasseroberfläche und
- Bildung von Falten im Schnitt an Übergangsstellen zwischen Probe und Kunstharz aufgrund unterschiedlicher Schneideeigenschaften und Spannungen im Präparateblock.

Die aufgeführten Schwierigkeiten ließen sich durch Nachtrimmen des Präparates, Korrektur der Präparat-, Messerausrichtung oder Präparataustausch weitestgehend beheben.

4.2.2 Elektronenmikroskopische Auswertung

Die angefertigten Dünnschnitte wurden anschließend kontrastiert und in einem Transmissionselektronenmikroskop (TEM Zeiss 910) ausgewertet. Bei der Beurteilung der Schnittqualität und Zellerhaltung wurden gelegentlich folgende Phänomene beobachtet:

- zerstörte oder schlecht erhaltene Zellmembranen,
- gequollene Zellen,
- Falten durch das Schneiden,
- schwache Kontrastierung und
- schlechte intrazelluläre Strukturerhaltung (schlechte Auflösung, verwischte Strukturen).

Im Falle von mangelhafter Zellmorphologie wurden die Präparation und Einbettung von Zellen wiederholt.

Bei der Identifizierung und Lokalisierung von intrazellulären Viruspartikeln traten gelegentlich die folgenden Phänomene auf:

- Die Unterscheidung von zellulären Vesikeln und Pestiviruspartikeln anhand ihrer Morphologie war in einigen Zellkompartimenten nur eingeschränkt möglich. So fanden sich in multivesikulären Körperchen nicht infizierter Zellen Partikel, die den zugrunde gelegten Kriterien für Identifizierung von Pestivirionen (siehe Kapitel 3.2.11, Seite 56) entsprachen.

- Die Identifizierung von Viruspartikeln (VPs) war daher nur in den Kompartimenten ER, Golgi und in zellulären Transportvesikeln eindeutig möglich, wobei je nach Zellanschnitt eine Differenzierung der ER Membranen, der Vesikelmembranen von ERGIC („Endoplasmatic Reticulum Golgi Intermediate Compartment“) und TGN („Trans-Golgi-Network“) aufgrund morphologischer Kriterien nicht eindeutig möglich war.
- Die Darstellung von intrazellulären Viruspartikeln war meist weniger eindeutig als die der extrazellulären Viruspartikel; dadurch wurde ihre Identifizierung erschwert.

In den nun folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchungen zur Darstellung von Viruspartikeln für jedes Infektionsmodell einzeln beschrieben und anhand von ausgewählten EM Bildern illustriert. In Tab. 8 auf Seite 83 werden die Befunde zusammengefasst dargestellt.

Die Legende für die Abkürzungen, die zur Beschriftung der elektronenmikroskopischen Bilder verwendet wurden, findet sich in Tab. 7.

Tab. 7: Legende für verwendete Abkürzungen bei der Beschriftung von EM Bildern.

Abkürzung	Bedeutung
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EZR	Extrazellulärraum
G	Golgi-Komplex
Lys	Lysosom
M	Mitochondrium
MLK	Multilamelläres Körperchen
MVK	Multivesikuläres Körperchen
N	Nukleus, Zellkern
VP	Viruspartikel
ZP	Zytoplasma

4.2.2.1 Infektionsmodell BVDV-1 „NADL“

Mit BVDV-1 „NADL“ infizierte MDBK-Zellen wurden 10 h p. i. fixiert, entwässert und in Epoxid-Harz eingebettet. Es wurden Einbettungen nach der „Monolayer“-Methode, bei der die Zellen horizontal angeschnitten werden und nach der „Sandwich“-Methode, bei der die Zellen vertikal angeschnitten werden, durchgeführt. Nach dem gleichen Protokoll wurden jeweils nicht infizierte MDBK-Zellen als Negativkontrolle präpariert.

Zellmorphologie: Die Morphologie der infizierten Zellen unterschied sich nicht signifikant von der Morphologie nicht infizierter Zellen. Es wurden keine deutlichen Alterationen zellulärer Membranen beobachtet. Anzeichen für Apoptose lagen nicht vor.

Pestiviruspartikel: Viruspartikel konnten weder intrazellulär noch extrazellulär dargestellt werden. Daher wurden keine weiteren Präparate zu anderen Zeitpunkten nach der Infektion angefertigt.

4.2.2.2 Infektionsmodell BVDV-2 „890“

Mit BVDV-2 „890“ infizierte MDBK-Zellen wurden 10 h, 13 h und 16 h p. i. fixiert, entwässert und in Epoxid-Kunstharz eingebettet. Es wurden Einbettungen nach der „Sandwich“-Methode durchgeführt. Nicht infizierte MDBK-Zellen wurden nach dem gleichen Protokoll als Negativkontrolle präpariert.

Zellmorphologie: Die Morphologie der infizierten Zellen unterschied sich nur in geringem Maße von der Morphologie nicht infizierter Zellen. Gelegentlich erschienen die Lumina des rER dilatiert. Darüber hinaus wurden keine deutlichen Alterationen zellulärer Membranen beobachtet. Gelegentlich wurden Zellschnitte mit stark kondensiertem und kontrastiertem Zytoplasma gefunden.

Pestiviruspartikel: Es konnten zu allen Fixierungszeitpunkten p. i. sowohl intrazellulär als auch extrazellulär Viruspartikel dargestellt werden. Die Zellorganellen, in denen intrazelluläre Viruspartikel gefunden wurden, konnten morphologisch als rER-Lumina, Golgi-Komplexe und kleine Vesikel identifiziert werden (s. Abb. 16).

Die Zahl der aufgefundenen Viruspartikel war sehr niedrig. In den meisten Zellschnitten traten keine Viruspartikel auf und selten wurde mehr als 1 VP pro Zellschnitt identifiziert. Zwischen den einzelnen Fixierungszeitpunkte konnten keine eindeutigen Unterschiede in der VP-Verteilung und Häufigkeit ermittelt werden.

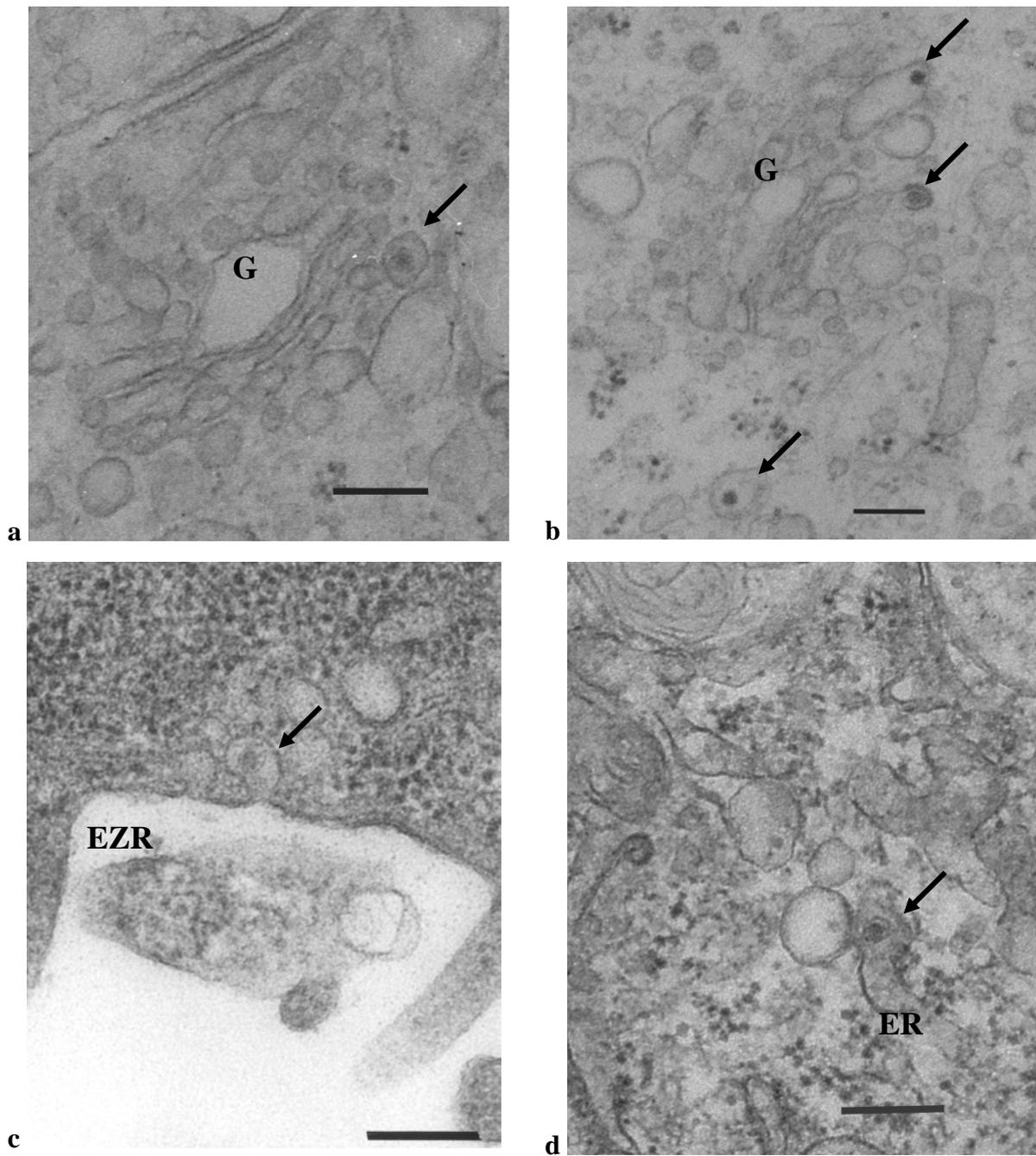


Abb. 16: Nachweis von VPs in mit BVDV-2 „890“ infizierten MDBK Zellen.

a) VP in Vesikel assoziiert mit Golgi-Komplex, 16 h p. i. (Bild Nr. 485) **b)** Drei VPs in vesikulären Strukturen (evtl. auch Lumen des ER), 13 h p. i. (Bild Nr. 487) **c)** VP in Vesikel, geöffnet zum Extrazellulärraum, 10 h p. i. (Bild Nr. 390) **d)** VP im Lumen des ER, 10 h p. i. (Bild Nr. 397). Balken entspricht 200 nm. Pfeile deuten auf VPs.

4.2.2.3 Infektionsmodell „Giraffe-1“

Mit dem Pestivirus „Giraffe-1“ infizierte MDBK-Zellen wurden 12 h, 13 h und 15 h p. i. fixiert, entwässert und in Epoxid-Harz eingebettet. Es wurden Flacheinbettungen nach der „Monolayer“-Methode, nach der „Sandwich“-Methode sowie Blockeinbettungen von Zellpellets durchgeführt. Parallel wurden nicht infizierte MDBK-Zellen als Negativkontrollen präpariert.

Zellmorphologie: Die Morphologie der infizierten Zellen unterschied sich nur in geringem Maße von der Morphologie nicht infizierter Zellen. Gelegentlich erschienen die Lumina des rER infizierter Zellen dilatiert. Darüber hinaus wurden keine deutlichen Alterationen zellulärer Membranen beobachtet. Als frühe Anzeichen für Apoptose der Zellen konnten ab 13 h p. i. regelmäßig auftretende stark angefärbte Zellschnitte mit kondensiert erscheinendem Zytoplasma angesprochen werden. Verstärkte Vakuolisierung trat in einigen Zellschnitten auf. Allerdings konnte nur nach Verwendung der „Monolayer“-Einbettungsmethode bei horizontalem Zellanschnitt eine stärkere Vakuolisierung im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen beobachtet werden. Klassische morphologische Zellalterationen der Apoptose wie Chromatinkondensation und „Blebbing“ der Zellmembran traten zu den gewählten Untersuchungszeitpunkten nicht auf.

Pestiviruspartikel: Die Auswertung der mit „Giraffe-1“ infizierten MDBK-Zellen lieferte im Vergleich zu den anderen Infektionsmodellen die meisten positiven Befunde (Abb. 17). Bei der Untersuchung von infizierten Zellen 12 h p. i. wurden VPs im ER Lumen (Abb. 17 a und b), in intrazellulären Vesikeln und extrazellulär an der Plasmamembran gefunden. Zu späteren Zeitpunkten (13 h, 15 h) ließen sich VPs darüber hinaus vereinzelt in Golgi-Komplexen nachweisen (Abb. 17 c). In Abb. 17 b liegen VPs in einem dilatierten Lumenabschnitt des ER vor, der eine ER „Exit Site“ darstellt, da die ER-Membran dort nicht mit Ribosomen besetzt ist. Abb. 17 f zeigt VPs im Lumen von Vesikeln oder vom ER, bei denen eine Verbindung zwischen Virushülle und Vesikelmembran auffällt. Es bleibt unklar, ob die Verbindung als ein letzter Schritt des „Budding“ oder auch als spezifische Bindung des VPs an ein Transportvesikel gesehen werden kann. In wenigen Fällen wurden VPs in Vesikeln gefunden, die zum Extrazellulärraum geöffnet waren (Abb. 17 g und h). Das Vesikel in Abb. 17 h unterscheidet sich morphologisch eindeutig von den „Clathrin coated pits“ (gezeigt in Abb. 17 j), über die Pestiviren in Zellen hineingelangen können.

Daher handelt es sich wahrscheinlich bei dieser Aufnahme um den Moment der Freisetzung von VPs. Die Häufigkeit des Auftretens von extrazellulär liegenden VPs (Abb. 17 g bis j) nahm zu, je später der Fixierungszeitpunkt p. i. gewählt war.

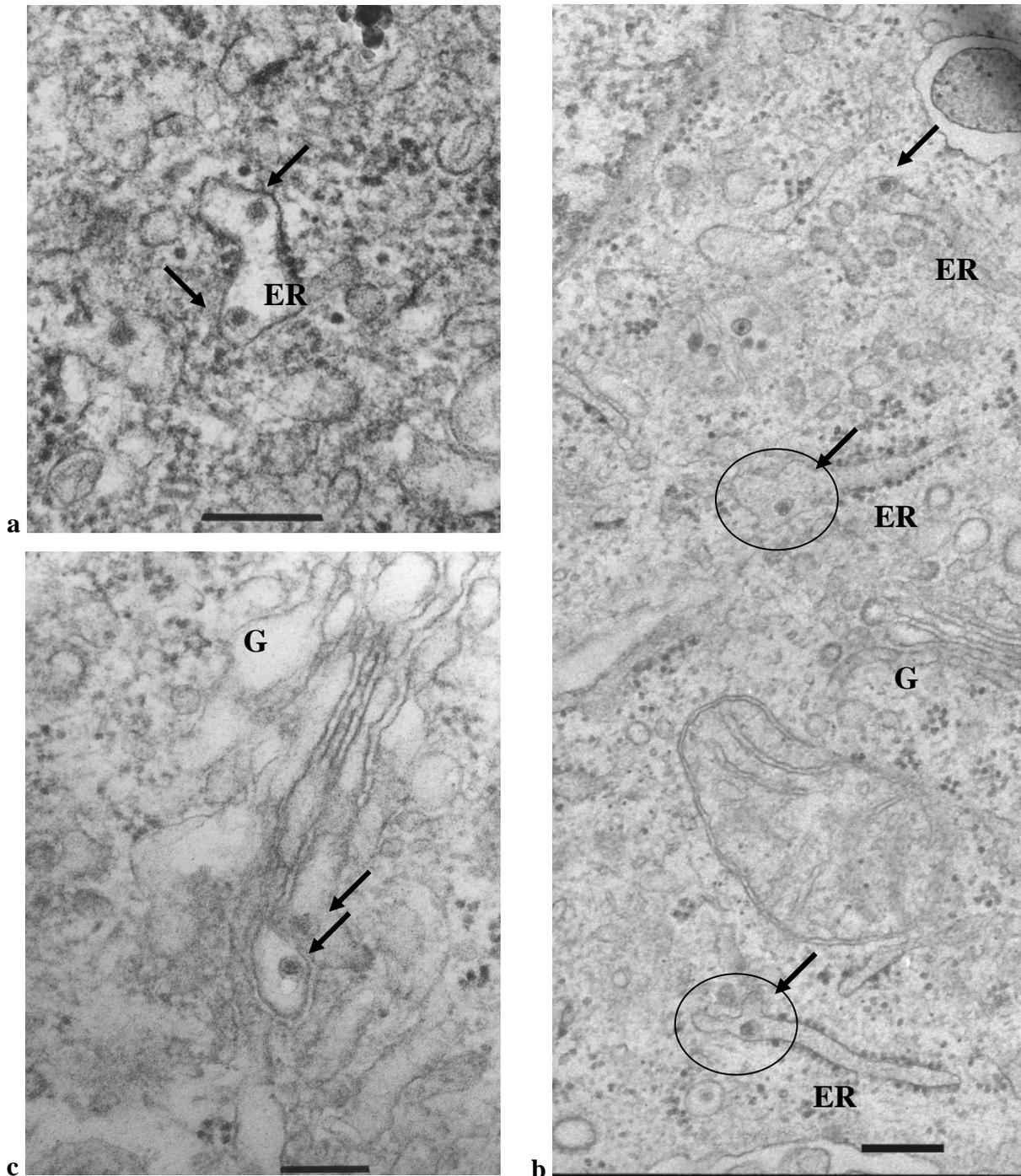
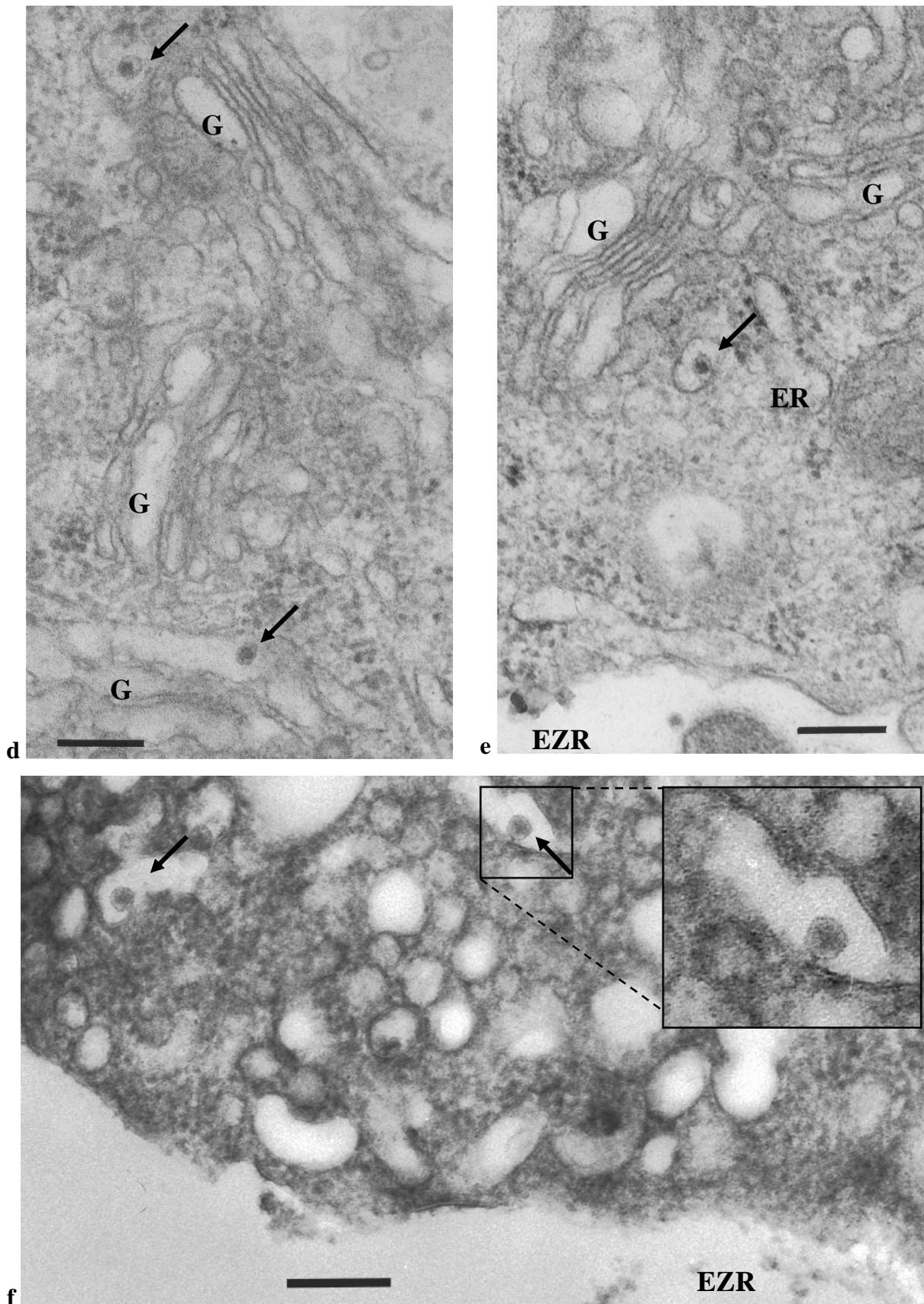
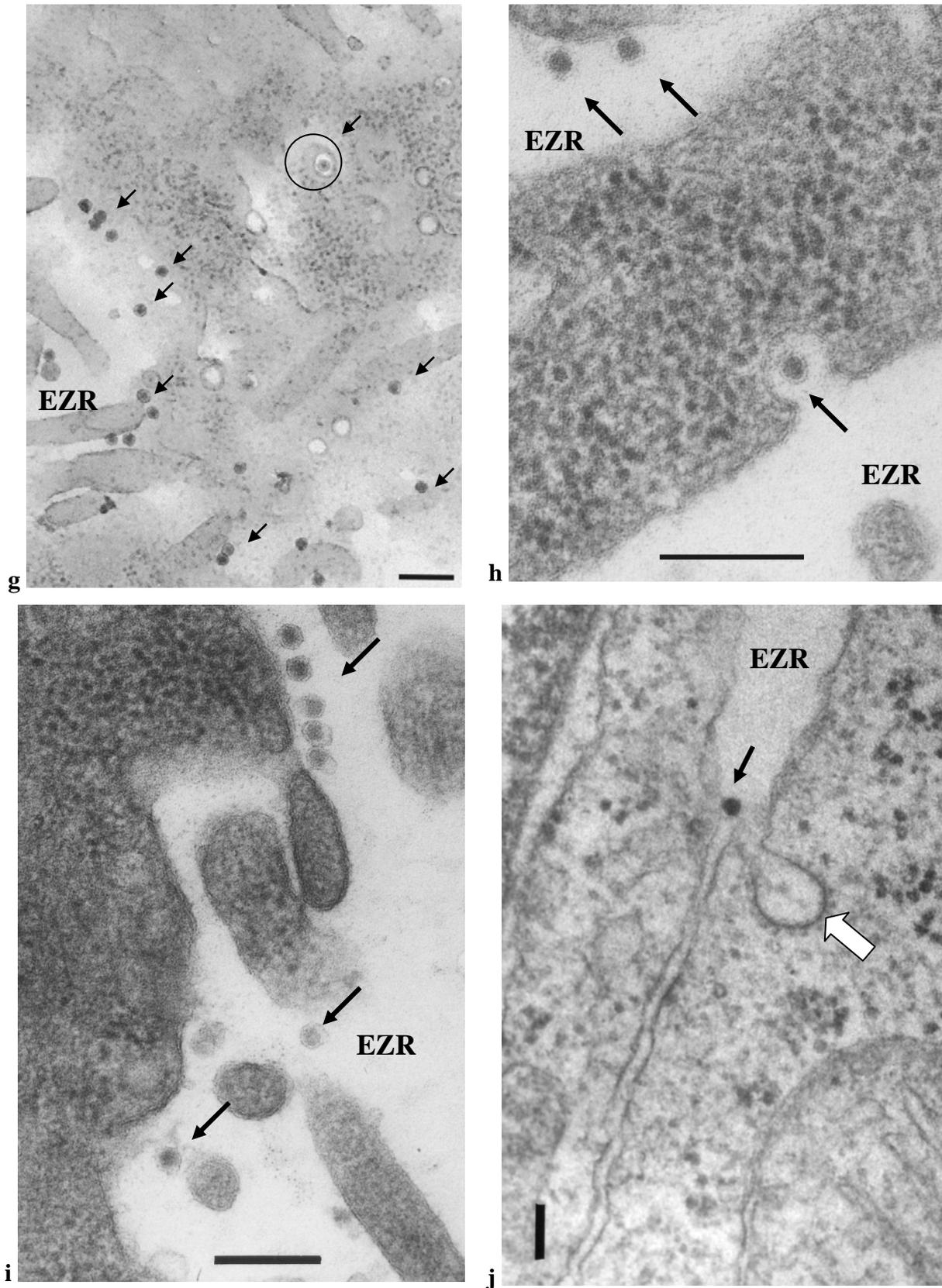


Abb. 17: Nachweis von VPs in mit dem Pestivirus „Giraffe-1“ infizierten MDBK Zellen.

a) Zwei VPs in ER Lumen, 13 h p. i. (Bild Nr. 399) **b)** Drei VPs in ER Lumina, 12 h p. i. (Bild Nr. 278) **c)** Zwei VPs im Lumen von Golgi-Membrankomplexen, 15 h p. i. (Bild Nr. 407). Balken entspricht 200 nm. Pfeile deuten auf VPs.



zu Abb. 17 d) VP in Lumen von Golgi und assoziiertem Vesikel, 13 h p. i. (Bild Nr. 406) **e)** VP in Vesikel assoziiert mit Golgi und ER, 13 h p. i. (Bild Nr. 402) **f)** Zwei VPs in Vesikeln oder ER Lumina, Verbindung zwischen Virushülle und Vesikelmembran, 13 h p. i. (Monolayer-Einbettung = horizontaler Anschnitt) (Bild Nr. 1546). Balken entspricht 200 nm. Pfeile deuten auf VPs.



g) Mehrere extrazelluläre VPs, ein VP in geöffnetem Vesikel (eingekreist), 13 h p. i. (Monolayer-Einbettung = horizontal geschnitten) (Bild Nr. 1549) **h**) VP in zum Extrazellulärraum geöffnetem Vesikel, 13 h p. i. (Bild Nr. 401) **i**) mehrere extrazelluläre VPs an der Zellmembran, 15 h p. i. (Bild Nr. 387) **j**) weißer Pfeil deutet auf Endozytose Vesikel „Clathrin coated pit“, daneben VP im EZR, 12 h p. i. (Bild Nr. 283). Balken entspricht 200 nm (a-i) bzw. 100 nm (j). Schwarze Pfeile deuten auf VPs.

Weiterhin wurden in multivesikulären Körperchen (MVK), die dem endosomalen Kompartiment der Zelle zugeordnet werden, virusähnliche Partikel gefunden (Abb. 18). Eine eindeutige Identifizierung von VPs über die Größe und Morphologie konnte hier nicht vorgenommen werden, da MVK in nicht-infizierten Zellen ebenfalls Partikel mit gleicher Größe und ähnlicher Form enthielten (Bilder nicht gezeigt). Allerdings ist hervorzuheben, dass eine hexagonale Form der Partikel nur in MVKs infizierter Zellen beobachtet wurde. Abb. 18 a zeigt neben möglichen Viruspartikeln ein gefülltes Vesikel mit einem Durchmesser von ca. 100 nm (eingekreister Bereich). Dieses Vesikel weist eine Verbindung zur MVK-Membran auf und steht in Kontakt zu einer vesikulären Struktur (evtl. Anschnitt des ER) im Zytoplasma, die wiederum virusähnliche Partikel enthält.

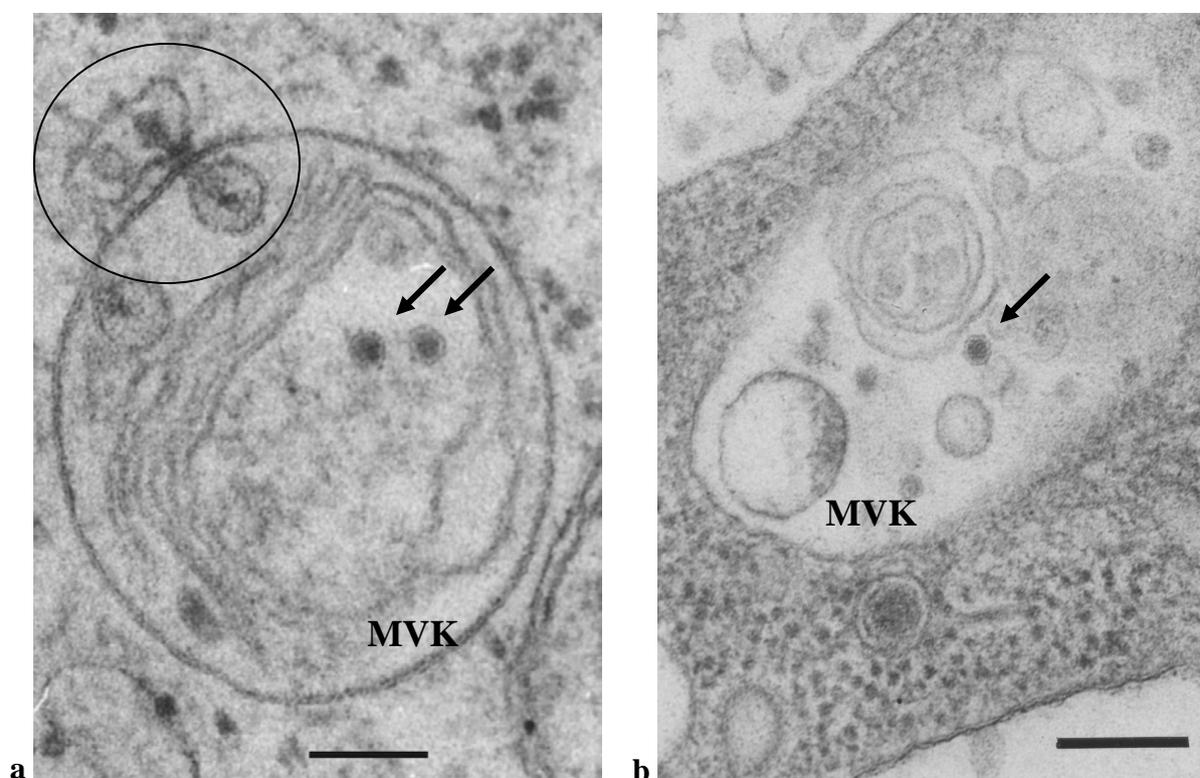


Abb. 18: Mögliche VPs in multivesikulären Körperchen (MVK) in mit dem Pestivirus „Giraffe-1“ infizierten MDBK Zellen.

a) Zwei VP-artige Strukturen in MVK-Lumen, eingekreist: kleines Vesikel in Verbindung zur MVK-Membran, 12 h p. i. (Bild Nr. 280) b) Eine VP-artige Struktur in MVK-Lumen, 15,5 h p. i. (Bild Nr. 413). Balken entspricht 200 nm. Pfeile zeigen auf mögliche VPs.

4.2.2.4 Transfektionsmodell BVDV-1 „cp7“

Mit dem BVDV-1 Stamm „cp-7“ transfizierte MDBK-Zellen wurden 10 h und 12 h p. t. fixiert, entwässert und in Epoxid-Harz eingebettet. Es wurden Flacheinbettungen nach der „Sandwich“-Methode durchgeführt. Nach den jeweils gleichen Protokollen wurden nicht-transfizierte MDBK-Zellen als Negativkontrollen präpariert.

Die elektronenmikroskopische Auswertung der angefertigten Ultradünnschnitte führte zu folgenden Ergebnissen:

Zellmorphologie: Die Ultrastruktur der Zellen war gut erhalten, es konnten keine Alterationen oder Schädigungen durch die Elektroporation festgestellt werden. Im Vergleich zu den Kontrollzellen konnten ebenfalls keine Auffälligkeiten gefunden werden.

Pestiviruspartikel: Sowohl 10 h als auch 12 h p. t. konnten weder intrazellulär noch extrazellulär VPs gefunden werden.

4.2.3 Zusammenfassung der EM-Ergebnisse zur Darstellung von Pestivirionen

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen zur Darstellung von Pestiviruspartikeln erlaubten bei den Infektionsmodellen BVDV-2 „890“ und „Giraffe-1“ die Darstellung von intra- und extrazellulären Viruspartikeln. Die negativen Befunde bei dem Transfektionsmodell BVDV-1 „cp-7“ können durch die vergleichsweise niedrigen Virustiter (10^5 TCID₅₀/ml), die nach der initialen Virusfreisetzung im Überstand erreicht werden, erklärt werden. Bei BVDV-1 „NADL“ kann das negative Untersuchungsergebnis auf diese Weise allerdings nicht erklärt werden, da sowohl die Wachstumskurve als auch die Ergebnisse der NS-Quantifizierung den Modellen „Giraffe-1“ und BVDV-2 „890“ sehr ähnlich sind. Die folgende Tabelle fasst die Befunde der ultrahistologischen Untersuchung zusammen.

Tab. 8: Ergebnisübersicht der EM-Untersuchungen zur Darstellung von Pestiviruspartikeln.

Infektionsmodell	Befunde	Fotos
BVDV-1 „NADL“ (10 h p. i.)	keine VPs keine deutlichen Membranalterationen	-
BVDV-2 „890“ (10 h, 13 h, 16 h p. i.)	niedrige Anzahl von Viruspartikeln extrazellulär und intrazellulär zu allen Zeitpunkten Lokalisation: rER Lumen, Golgi-Komplex, kleine Vesikel keine deutlichen Membranalterationen	Abb. 16
„Giraffe-1“ (12 h, 13 h, 15 h p. i.)	Viruspartikel extrazellulär (15 h p. i. >> 12 h p. i.) regelmäßiges Auftreten von Viruspartikeln intrazellulär zu allen Zeitpunkten Lokalisation: rER Lumen (auch ER „exit sites“), Golgi-Komplex, kleine Vesikel (selten: zum Extrazellulärraum geöffnet); mögliche VPs in MVKs ggr. Dilatation von ER Lumina, keine deutlichen Membranalterationen	Abb. 17
BVDV-1 „cp7“ (10 h, 12 h p. t.)	keine VPs keine deutlichen Membranalterationen	-

4.3 Elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Nachweis von Virusproteinen (Immun-Ultrahistologie)

4.3.1 Immunogoldmarkierungen an Kunstharzschnitten

4.3.1.1 „Pre-Embedding“ Immunmarkierungen an mit Pestiviren infizierten Zellen

In der Literatur gibt es Berichte über erfolgreiche Immunogoldmarkierung von extrazellulären Pestivirionen in Dünnschnitten (Weiland, E. et al., 1992; 1999). Es sollte untersucht werden, ob mit dem zur Verfügung stehenden Infektionsmodell „Giraffe-1“ ähnliche Ergebnisse erzielt werden können. Für eine „Pre-Embedding“ Immunmarkierung wurden infizierte Zellen wie bei der konventionellen Flacheinbettung präpariert, mit dem Unterschied, dass vor der Einbettung der Zellrasen zunächst mit den Primär- und anschließend mit dem Goldkonjugierten Sekundär-Ak inkubiert wurde, wodurch Viruspartikel an der Zelloberfläche markiert werden sollten. Als Virus-/ Zellsystem wurde „Giraffe-1“ auf MDBK-Zellen 15 h p. i. eingesetzt, da bei Voruntersuchungen (siehe Kap. 4.2.2.3) eine hohe Anzahl von Virionen an der Zelloberfläche vor Manifestation des zpE gefunden wurde. Als erste Ak wurden mAk gegen E2 (SCR60) und gegen E^{mns} (50F4) eingesetzt. Die elektronenmikroskopische Auswertung der angefertigten Ultradünnschnitte führte zu folgenden Ergebnissen:

Zellmorphologie: Die Erhaltung und Darstellung der Zellmorphologie war befriedigend. Die Identifizierung von Zellorganellen war möglich und die Plasmamembran erschien größtenteils intakt. Aufgrund des Zeitpunkts von 15 h p. i. zeigten einige Zellen bereits Anzeichen für beginnende Apoptose durch starke Färbung von kondensiert erscheinendem Zytoplasma.

Pestiviruspartikel/ Immunmarkierung: Es wurden zahlreiche Viruspartikel entlang der Plasmamembran im Extrazellulärraum gefunden, wobei an der Apikalseite der obersten Zellschicht die wenigsten VPs auftraten. Dies ist vermutlich auf einen Verlust von VPs durch Abgang in den Überstand während der Inkubation oder als Folge der im Protokoll enthaltenen Waschvorgänge zurückzuführen. Weiterhin wurden VPs in zum Extrazellulärraum geöffneten Vesikeln gefunden (Abb. 19 b). Eine Goldmarkierung von VPs war sowohl beim Einsatz des antiE2, als auch des antiE^{mns} Ak nur selten erfolgreich. VPs waren zudem fast immer nur mit einzelnen Goldpartikeln markiert (siehe Abb. 19 a). In den Kontrollen (infizierte Zellen ohne 1. Ak) wurde keine Markierung von VPs gefunden. Somit konnte mithilfe dieser Methode der Nachweis von E2 und E^{mns} an VPs geführt werden, allerdings nur mit unbefriedigender Effizienz.

Variationen des Protokolls in Bezug auf die Vorfixierung der Zellen (keine Fixierung, 10 min 1 % PFA, 1 h 2 % PFA) hatten keinen Einfluss auf die Markierungsrate. Ursachen für die schwache Markierung können u. a. in der Bindungsaffinität der Ak oder in der Zugänglichkeit der Antigene liegen.

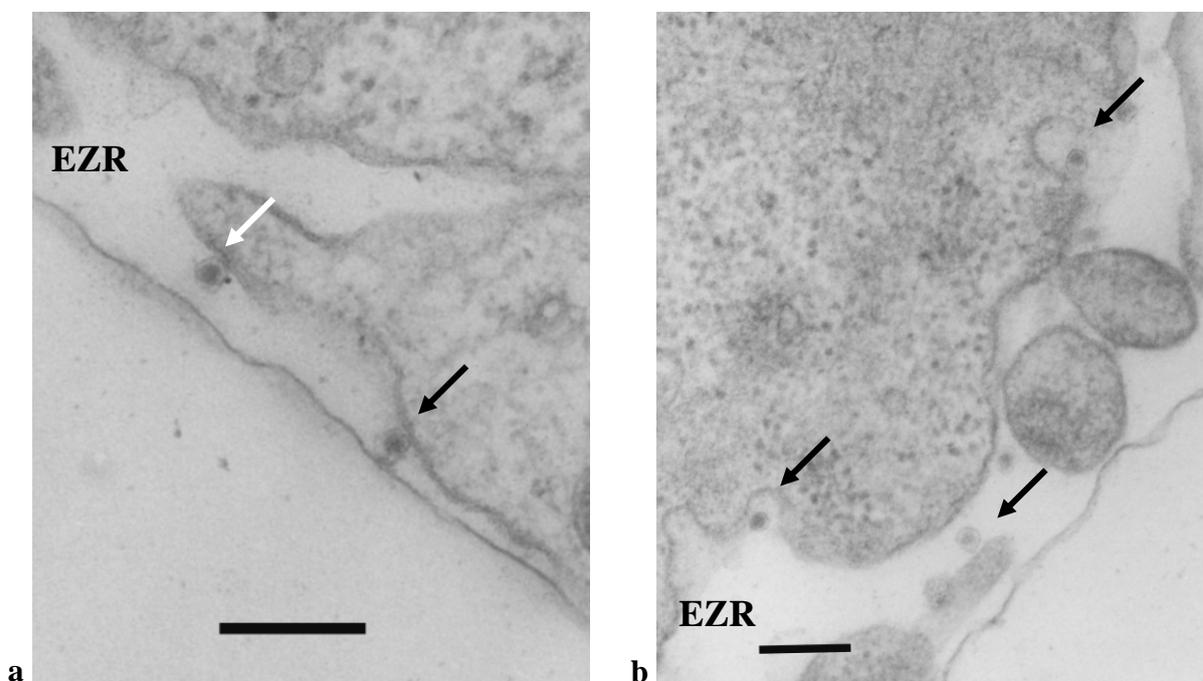


Abb. 19: Darstellung und Immunmarkierung von extrazellulären VPs an mit dem Pestivirus „Giraffe-1“ infizierten MDBK Zellen 15 h p. i.

a) Schwache Gold-Markierung von VPs (weißer Pfeil) im EZR, mAk antiE2 (SCR60), Ziege antiMaus IgG conj. 10 nm Gold (Bild Nr. 600) **b)** VPs (nicht markiert) zum Teil in zum EZR geöffneten Vesikeln (Bild Nr. 595). Balken entspricht 200 nm. Schwarze Pfeile zeigen auf nicht markierte VPs.

4.3.1.2 „Post-Embedding“-Immunmarkierungen

Ein Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Verteilungsmuster von Pestivirusproteinen in infizierten Kulturzellen auf ultrahistologischer Ebene. Für eine Immunmarkierung sind Zellschnitte nach Epoxid-Harz-Einbettung ungeeignet, da eine geringe Antigenzugänglichkeit im Schnitt vorliegt. Die Präparation beinhaltet starke Fixierungen (mit OsO₄ und GA) und Erhitzen der Zellen auf 60 °C für 48 h. Diese Faktoren tragen zu einer geringen Erhaltung und verminderten Erreichbarkeit von Antigenen bei. Daher wurde für die Markierungsversuche eine Einbettung in das Acrylharz LR Gold (Polymerisation in Kälte unter UV-Licht) angewandt. Die auspolymerisierten Präparate eigneten sich sehr gut zur Anfertigung von Dünnschnitten mit gleichmäßiger Dicke (ca. 100 nm).

Da die Zellen allerdings ähnlich wie bei der Blockeinbettung mit Epoxidharzen als loses Pellet in Suspension während der Polymerisierung vorlagen, schwankte die Zelldichte im Schnitt stark und eine Beurteilung der Zellorientierung im Zellverbund war nicht möglich. Zur Etablierung der Methode wurden Markierungsversuche in Zellkultursystemen durchgeführt, die durch Überexpression pestiviraler Strukturproteine eine besonders hohe Antigenkonzentration versprachen (siehe Tab. 9).

Tab. 9: Verwendete Expressionssysteme.

Expressionssystem	Expression von	Herkunft	Ag-Lokalisation
SF21 (Insektenzellen) und Baculovirussystem	E2	BVDV-2 „890“	Endoplasmatisches Retikulum
SK6, Tet-on System	E ^{rms} -E1-E2-p7	BVDV-1 „ncp7“	Endoplasmatisches Retikulum
BHK-21, Tet-on System	E2 + HA (Influenzavirus)	BVDV-1 „NADL“	Plasmamembran

4.3.1.2.1 Markierung von E2 im Baculovirus-Expressionssystem

Das Baculovirus-Expressionssystem auf der Basis modifizierter Varianten des *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus (AcNPV) wird häufig für die heterologe Expression von Glykoproteinen eingesetzt. Das rekombinante Baculovirus „AcNPV-890/E2“ exprimiert nach Infektion von Insektenzellen (SF-21) das vollständige Strukturprotein E2 von BVDV-2 „890“ (mit Membrananker). Zur Kontrolle des Expressionsverlaufs wurde für die vorliegende Arbeit 24 h, 48 h und 72 h p. i. ein IIFT zum Nachweis des E2 Proteins (1. Ak: antiE2 (SCR60)) durchgeführt. 24 h p. i. waren ca. 5 %, 48 h p. i. ca. 15 % und 72 h p. i. ca. 50 % der Zellen positiv. 72 h p. i. zeigte ein Teil der Zellen einen zpE und hatte sich als Folge der Baculovirusinfektion bereits aus dem Zellrasen gelöst. Infizierte und nicht-infizierte SF-21 Zellen wurden 72 h p. i. in „LR Gold“ eingebettet und Ultradünnschnitte angefertigt. Die elektronenmikroskopische Auswertung führte zu folgenden Ergebnissen:

Zellmorphologie: Die Darstellung der zellulären Strukturen, insbesondere der Membranen, erwies sich als nicht befriedigend; eine Identifizierung von Zellorganellen war häufig nicht möglich.

Insgesamt wirkten die Zellen aufgequollen und beschädigt. Baculoviren konnten in vielen Zellen dargestellt werden. Durch die massive Virusentstehung und die damit einhergehende Zellschädigung wurde die morphologische Auswertbarkeit massiv eingeschränkt.

Immunmarkierung: In wenigen Zellanschnitten konnte eine „perlschnurartige“ Markierung (Intensität: +/++) des E2 Proteins (möglicherweise entlang von Membranen) oder gehäuft an amorphen kontrastreichen Strukturen festgestellt werden (siehe Abb. 20). Eine Zuordnung der Markierung zu bestimmten Zellkompartimenten war aufgrund der unbefriedigenden Zellmorphologie nicht möglich. Baculoviren wurden ebenfalls markiert, diese Markierung erwies sich allerdings als eine unspezifische Bindung des 2. Aks, da sie auch in der Kontrolle ohne Primär-Ak auftrat.

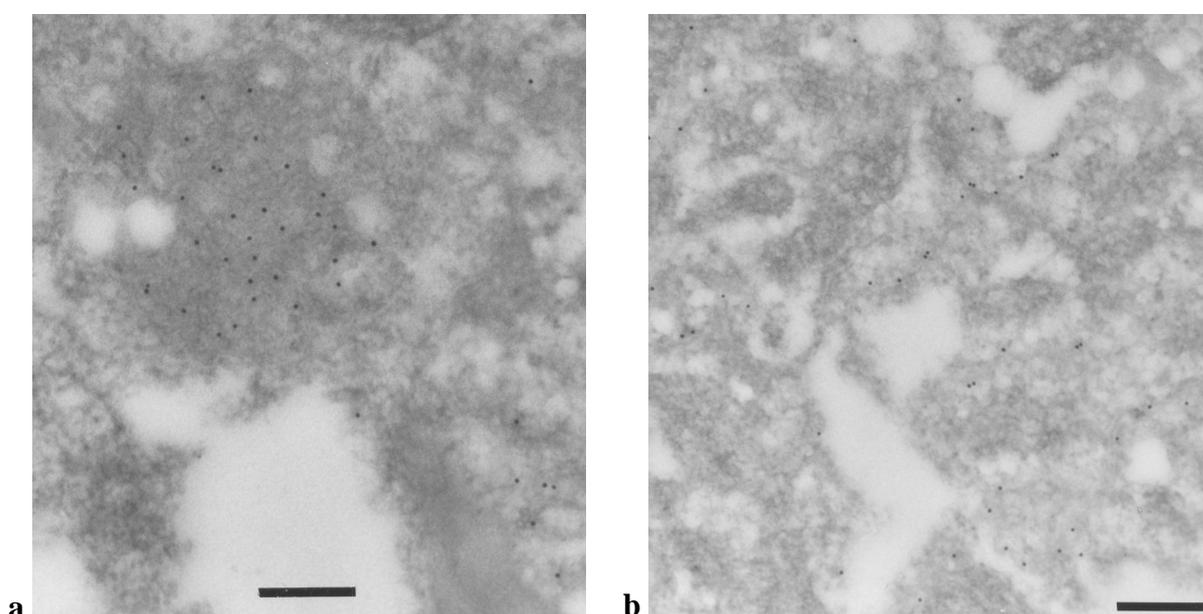


Abb. 20: Immunogoldmarkierung des E2-Proteins an SF-21 Zellen 72 h nach Infektion mit rekombinantem Baculovirus „AcNPV-890/E2“.

mAk antiE2 (SCR60), Ziege antiMaus IgG konj. 10 nm Gold. **a)** gehäufte Markierung an amorpher elektronendichter Struktur (Bild Nr. 605) **b)** lineare Markierung, entlang von Membranen? (Bild Nr. 606). Balken entspricht 200 nm (a) bzw. 250 nm (b).

4.3.1.2.2 Markierung von E2 im Tet-on Expressionssystem

Die verwendeten Zelllinien SK-6p830 und BHK-21p577 beinhalten durch stabile Transfektion ein pTet-on Regulatorplasmid, das eine Resistenz gegen das Aminoglykosid Geneticin (G418) vermittelt. Das Plasmid kodiert zudem für das Regulatorprotein „reverser tetrazyklin-kontrollierter Transaktivator“ (rtTA). RtTA erlaubt eine induzierbare Transkription und Überexpression des gewünschten Gens durch die Zugabe des Tetrazyklin-Derivates Doxyzyklin. An den zur Verfügung stehenden Expressionssystemen sollte das Pestivirus-Strukturprotein E2 nachgewiesen werden.

Die **SK-6 Zelllinie p830** enthält zusätzlich zum Regulatorplasmid die Gene zur Expression der Pestivirus-Strukturproteine E^{ms} – E1- E2 – p7 (BVDV-1 „ncp-7“). Der Nachweis für das E2-Protein wurde im ER erwartet, da die C-terminale Transmembrandomäne des Proteins ein Signal für Verbleib im ER darstellt.

In der **BHK-21-Zelllinie p577** (E2 –HA, BVDV-1 „NADL“) wird dieses Signal durch den Membrananker des Hämagglutinin-Proteins von Influenzaviren ersetzt, der als Signal für Transport zur Plasmamembran gilt, so dass hier der Nachweis von E2 an der Plasmamembran erwartet wurde.

Zunächst wurden induzierte Zellen im IIFT 12 h, 24 h und 48 h post inductionem (p. ind.) mit einem antiE2 Ak (SCR60) getestet, um einen geeigneten Zeitpunkt für die Einbettung zu finden. Die Fluoreszenz wurde wie erwartet bei SK-6 Zellen im Zytoplasma mit ER-typischer Verteilung und bei BHK-21 Zellen an der Plasmamembran nachgewiesen (siehe Abb. 21 a, b). Ab 24 h p. ind. wurde eine ausgeprägte Fluoreszenz aller Zellen festgestellt, daher wurden zu diesem Zeitpunkt die Einbettung in „LR Gold“ und die Immungoldmarkierung durchgeführt.

Zellmorphologie SK-6p830 und BHK-21p577: Die Darstellung der zellulären Strukturen, insbesondere der Membranen, erwies sich als nicht befriedigend. Eine Identifizierung von Zellorganellen war häufig durch fehlende Kontrastierung intrazellulärer Membranen unmöglich. Insgesamt wirkten die Zellen häufig aufgequollen und stark vakuolisiert.

Immunmarkierung SK-6p830: An einigen Zellen wurden Goldmarkierungen (Intensität: +/++) im ER-Lumen oder im Bereich der ER-Membranen gefunden, wobei die Membranen selbst nicht gut darstellbar waren (Abb. 21c). In manchen Fällen fand sich eine Markierung an Kernmembranen. Die Mehrzahl der Zellschnitte war nicht markiert. Die Kontrollen (induzierte Zellen ohne 1. Ak, nicht induzierte Zellen) zeigten nur sehr vereinzelte unspezifische Markierungen.

Immunmarkierung BHK-21p577: An fast jeder Zelle wurden Goldmarkierungen (Intensität: ++/+++) an den Außengrenzen der Zellen - insbesondere an Zellfortsätzen - gefunden, wobei die Darstellung der Plasmamembran nicht gelang (Abb. 21d). Vereinzelt wurden weitere Markierungen im Zytoplasma nahe der Plasmamembran gefunden, eine Zuordnung zu bestimmten Zellkompartimenten war aufgrund mangelnder Membrandarstellung nicht möglich. Die Kontrollen (induzierte Zellen ohne 1. Ak/ nicht induzierte Zellen) zeigten keine bzw. seltene vereinzelte Markierungen der Plasmamembran an.

Aufgrund der unbefriedigenden Zellmorphologie wurden Versuche zur Verbesserung des Protokolls unternommen, die einen Zusatz von PVP während der Entwässerung und Einbettung sowie alternative Wege zur Gewinnung des Zellpellets (Trypsinieren statt Abschaben, Einbettung des Zellpellets in Agar) beinhalteten. Diese Versuche führten jedoch zu keiner deutlichen Verbesserung der Zellmorphologie.

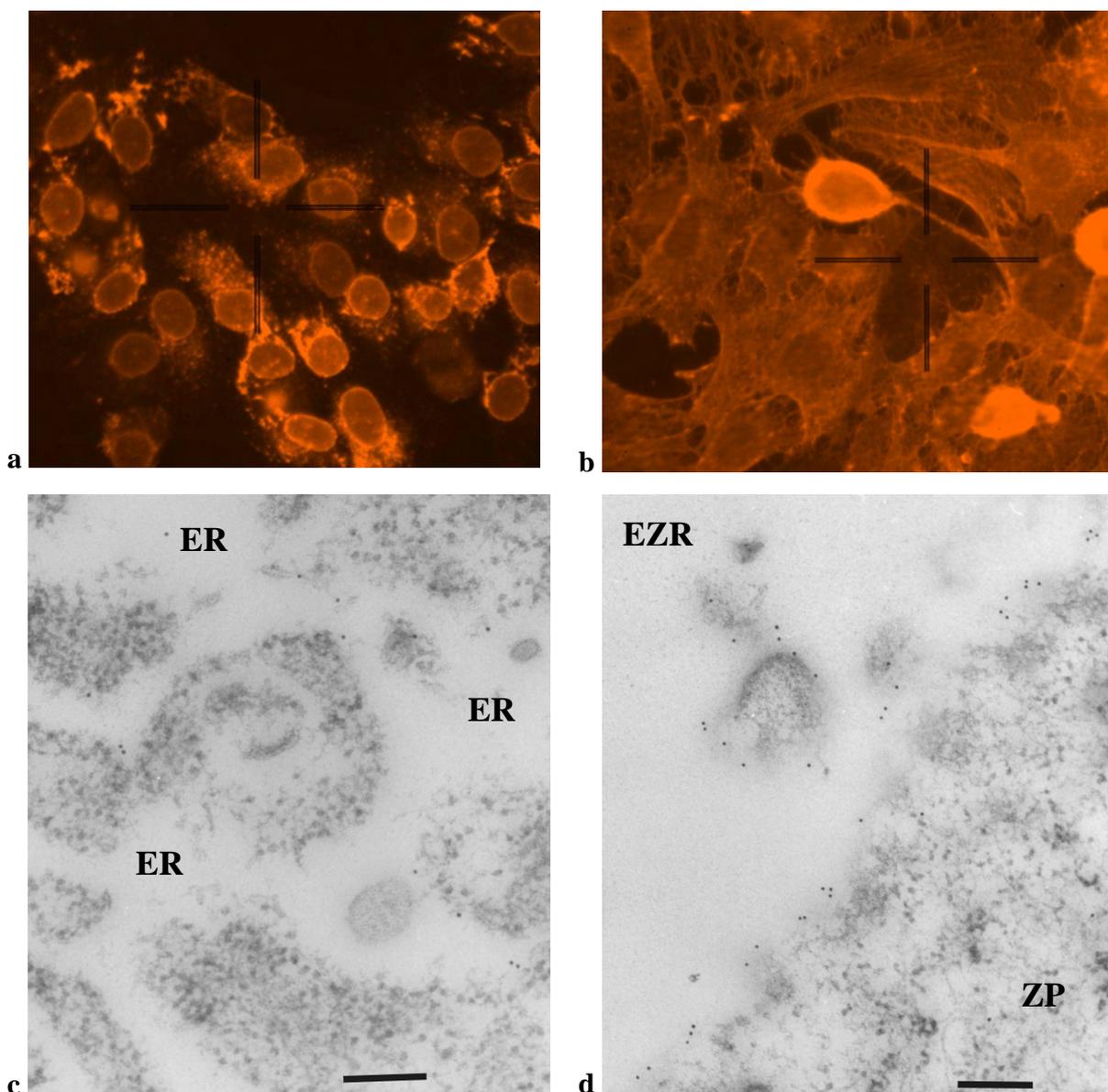


Abb. 21: Nachweis von E2 im Tet-on Expressionssystem 24 h p. ind. in IIFT und IEM (LR Gold)
a) und b): mAk antiE2 (SCR60), Ziege antiMaus IgG konj. Cy3. **a)** SK-6p830 Zellen, Fluoreszenz im Zytoplasma, ER typische Verteilung. **b)** BHK-21p577 Zellen, Fluoreszenz an Plasmamembran.
c) und d) mAk antiE2 (SCR60), Ziege antiMaus IgG konj. 10 nm Gold. **c)** SK-6p830 Zellen, Goldmarkierung im ER Lumen. (Bild Nr. 675) **d)** BHK-21p577 Zellen, Goldmarkierung entlang der Zellgrenze (Bild Nr. 685). Balken entspricht 200 nm.

4.3.2 Immunogoldmarkierungen an Kryodünnschnitten nach TOKUYASU

Aufgrund der unbefriedigenden Ergebnisse der „Post-Embedding“ Immunmarkierungen an Acrylharz-Schnitten bezogen auf Signalstärke und insbesondere auf Zellmorphologie wurde nach einer alternativen antigenerhaltenden Einbettung gesucht. Eine sehr gut geeignete Methode ist die Präparations- und Markierungsmethode nach TOKUYASU. Dabei werden Zellen nach Fixierung mit PFA in Gelatine mithilfe eines Kryoprotektors in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Schnitte werden bei ca. -120 °C hergestellt, wofür ein spezielles Gefrierultramikrotom benötigt wird. Im späteren Verlauf des Dissertations-Projekts stand ein solches Gerät (Leica Ultracut UC/FC 6) an der ZBB (Zentrale Biotechnische Betriebseinheit) der Justus-Liebig-Universität Giessen externen Nutzern zur Verfügung. Somit ergab sich in Verbindung mit der Teilnahme an einem Workshop zur Kryoultramikrotomie (von W. Möbius, Max Planck Institut für experimentelle Medizin, Göttingen) die Gelegenheit, die Methode für diese Arbeit am Institut zu etablieren.

Bei der Herstellung von Dünnschnitten nach TOKUYASU ergibt sich bei späterer Immunogoldmarkierung eine bessere Zugänglichkeit der Antigene, verbunden mit einer guten Erhaltung und Darstellung der Morphologie. Eine Beurteilung im ursprünglichen Zellverbund ist wie bei „LR-Gold“ nicht möglich, da die Probenpräparation das Abschaben der Zellen von der Kulturschale sowie das Pelletieren der Zellen beinhaltet. Bei Markierungsversuchen an Gefrierschnitten wurde zur Detektion Protein A Gold (PAG) konjugiert mit kolloidalem Gold eingesetzt. Protein A bindet mit hoher Affinität den Fc-Teil von IgG, z. B. von Kaninchen. Bei der Verwendung von Maus-Ak musste meist ein Brücken-Ak (Kaninchen anti-Maus IgG) eingesetzt werden, da die Bindungsaffinität von PAG für Maus IgG Subklassen unterschiedlich ist.

Die angefertigten Dünnschnitte wurden nach Immunmarkierung und Kontrastierung in einem TEM (Zeiss 910) ausgewertet. Bei der Beurteilung der Schnitte wurden gelegentlich folgende Mängel bemerkt:

- starke Faltenbildung im Schnitt („zerknitterte Schnittbänder“),
- starke Schrumpfung der Schnitte,
- schnelles Reißen der Schnitte unter dem Elektronenstrahl,
- Kontrastmittelkristalle,
- zu schwache/ zu starke Kontrastierung,
- schwache intrazelluläre Auflösung (verwischte Strukturen) und
- ausgewaschene Zellorganellen.

Je nach Ursache des Problems (Zelldichte, Fixierung, Schnittübertragung, Kontrastierung) wurde die Präparation an der entscheidenden Stelle wiederholt.

Tab. 7 (Seite 74) beinhaltet als Legende alle Abkürzungen, die zur Beschriftung der elektronenmikroskopischen Bilder in den folgenden Kapiteln verwendet wurden.

4.3.2.1 Markierungsversuche zur Etablierung der Immunogoldmarkierung an Gefrierdünnschnitten

Zur Etablierung des Verfahrens wurden vor der Untersuchung von Pestiviren zwei Studien durchgeführt, um die Methode auf ihre Sensitivität und Praktikabilität zu testen. Die erste Studie wurde an den bereits vorgestellten Zelllinien SK6p830 und BHK-21p577 durchgeführt, die die Markierung von E2 nach Überexpression erlauben. Auf Versuche mit dem Baculovirus-Expressionssystem, das beim „LR-Gold“ Verfahren nicht befriedigende Markierungsergebnisse erbrachte, wurde verzichtet. Stattdessen wurde ein Infektionsmodell mit dem Tollwutvirusstamm „CVS“ ausgewählt, da aus institutseigenen Vorversuchen bekannt war, dass eine hohe Virionen- und somit auch Antigenkonzentration im Zytoplasma infizierter Zellen vorliegt und entsprechende Antikörper zum Nachweis viraler Proteine am Institut zur Verfügung standen.

4.3.2.1.1 Markierungsversuche am Infektionsmodell Tollwutvirusstamm „CVS“ und BHK-21 Zellen

Dieses Infektionsmodell wurde ausgewählt, da aus Vorarbeiten am Institut (*López Yomayusa, 2009*) zur Morphogenese von Tollwutviren an Kunstharzschnitten bekannt war, dass zahlreiche Virionen im Zytoplasma infizierter BHK-21-Zellen vorliegen. BHK-21 Zellen wurden 48 h nach einer Infektion mit dem Stamm „CVS“ fixiert und für die Kryoeinbettung präpariert. Zur Erfolgskontrolle der Infektion wurde in einem Parallelansatz ein IIFT zum Nachweis des Nukleoproteins durchgeführt (polyklonaler Ak (pAk) gegen Tollwutvirus Nukleoprotein, Ziege anti-Kaninchen IgG konj. mit Cy3). Ein deutliches Fluoreszenzsignal im gesamten Zellrasen bestätigte den Erfolg der Infektion (siehe Abb. 22 a und b). Für die Immunogoldmarkierung an den Gefrierschnitten wurde der Sekundär-Ak durch Protein A Gold (PAG) konjugiert mit 10 nm Gold ersetzt, das direkt an den Kaninchen-Ak bindet, so dass bei diesem Ansatz auf den Einsatz eines Brücken-Ak verzichtet werden konnte.

Zellmorphologie: Die Darstellung der Zellmorphologie wurde als gut bewertet; es gelang eine Darstellung von Kernmembran, Plasmamembran sowie von Zellorganellen.

Weiterhin konnten entstehende Virionen im Zytoplasma, in MVKs und an der Plasmamembran dargestellt werden. Aufgrund der massiven Virusvermehrung kam es zu starken Alterationen der Zellmorphologie im Vergleich zu den Kontrollzellen (z. B. Entstehung von Virionen an intrazellulären Membranen, massives Auftreten von Virionvorstufen im Zytoplasma und im endosomalen Kompartiment). Aufgrund der hohen Viruslast war eine Identifizierung einzelner Zellkompartimente in vielen Bereichen infizierter Zellen nicht mehr möglich.

Immunmarkierung: An den infizierten Zellen wurden sehr häufig Immunogoldmarkierungen (Intensität: ++ \rightarrow +++) als Nachweis des Nukleoproteins gefunden (Abb. 22 c und d). Die Markierungen zeigten sowohl eine Assoziation mit (Vorstufen von) Virionen als auch starke fokale Häufungen im Zytoplasma. Letztere stellen eine starke Anreicherung des N-Proteins im Rahmen der Virusvermehrung dar und entsprechen dem punktförmigen Muster der Fluoreszenz im IIFT (siehe Abb. 22 a).

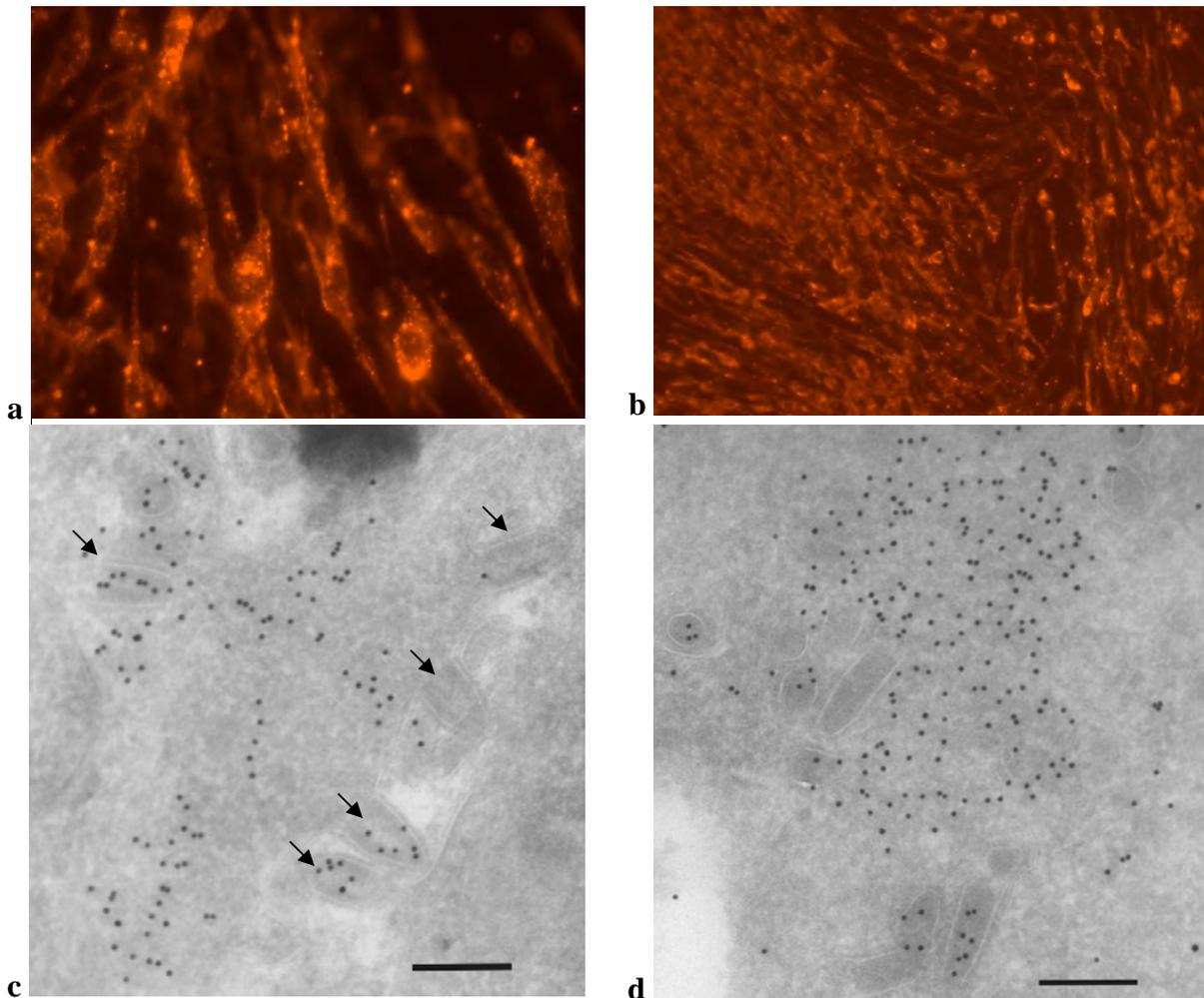


Abb. 22: Nachweis des Nukleoproteins von Tollwutvirusstamm „CVS“ in IIFT und IEM an Kryodünnschnitten.

BHK-21 Zellen 48 h p. i., **IIFT: a)** und **b)** Nachweis des Nukleoproteins im Zytoplasma, pAk antiN, Ziege antiKan. IgG konj. Cy3. **IEM: c)** und **d)** Nachweis des Nukleoproteins frei im Zytoplasma und an entstehenden VPs (schwarze Pfeile). pAk antiN, PAG 10 nm (Bild Nrn. 1871 und 1872). Balken entspricht 200 nm.

4.3.2.1.2 Markierung von E2 im Tet-on Expressionssystem

Für diese Markierungsversuche wurden SK6p830 und BHK-21p577 Zellen unter den Bedingungen wie in Kap. 4.3.1.2.2 beschrieben eingesetzt. Die Fixierung und Gefriereinbettung erfolgte ebenfalls 24 h p. ind.. Der E2-Nachweis wurde mit einem mAk antiE2 (SCR60) durchgeführt.

Zellmorphologie: Die Darstellung der Zellmorphologie wurde als gut bewertet, da eine Darstellung von Kernmembran, Plasmamembran sowie von Zellorganellen (ER, Golgi, Mitochondrien) gelang, die eine Zuordnung von Goldmarkierungen zu bestimmten Zellkompartimenten erlaubte. Die Zellen wirkten nicht aufgequollen oder grob beschädigt. Eine Veränderung der Zellmorphologie hinsichtlich Membranalterationen wurde im Vergleich von induzierten zu nicht-induzierten Zellen nicht festgestellt.

Immunmarkierung SK6p830: An den induzierten Zellen wurden regelmäßig Immunogoldmarkierungen (Intensität: ++) gefunden, die eine deutliche Assoziation zu ER- bzw. zu Kernmembranen zeigten (siehe Abb. 23 a und b). Diese Markierungen wurden an den Negativkontrollen (nicht-induzierte Zellen sowie induzierte Zellen ohne Primär-Antikörper (Ak)) nicht gefunden.

Immunmarkierung BHK-21p577: An den induzierten Zellen wurden häufig Immunogoldmarkierungen (Intensität: +++) gefunden, die eine deutliche Assoziation mit der Plasmamembran zeigten, insbesondere an Zellfortsätzen.

Weiterhin konnten Immunmarkierungen (Intensität: ++) mit Assoziation zu Membranen des ER und des Golgi gefunden werden, die den Transportweg des E2 Proteins innerhalb der Zelle kennzeichnen (siehe Abb. 23 c und d).

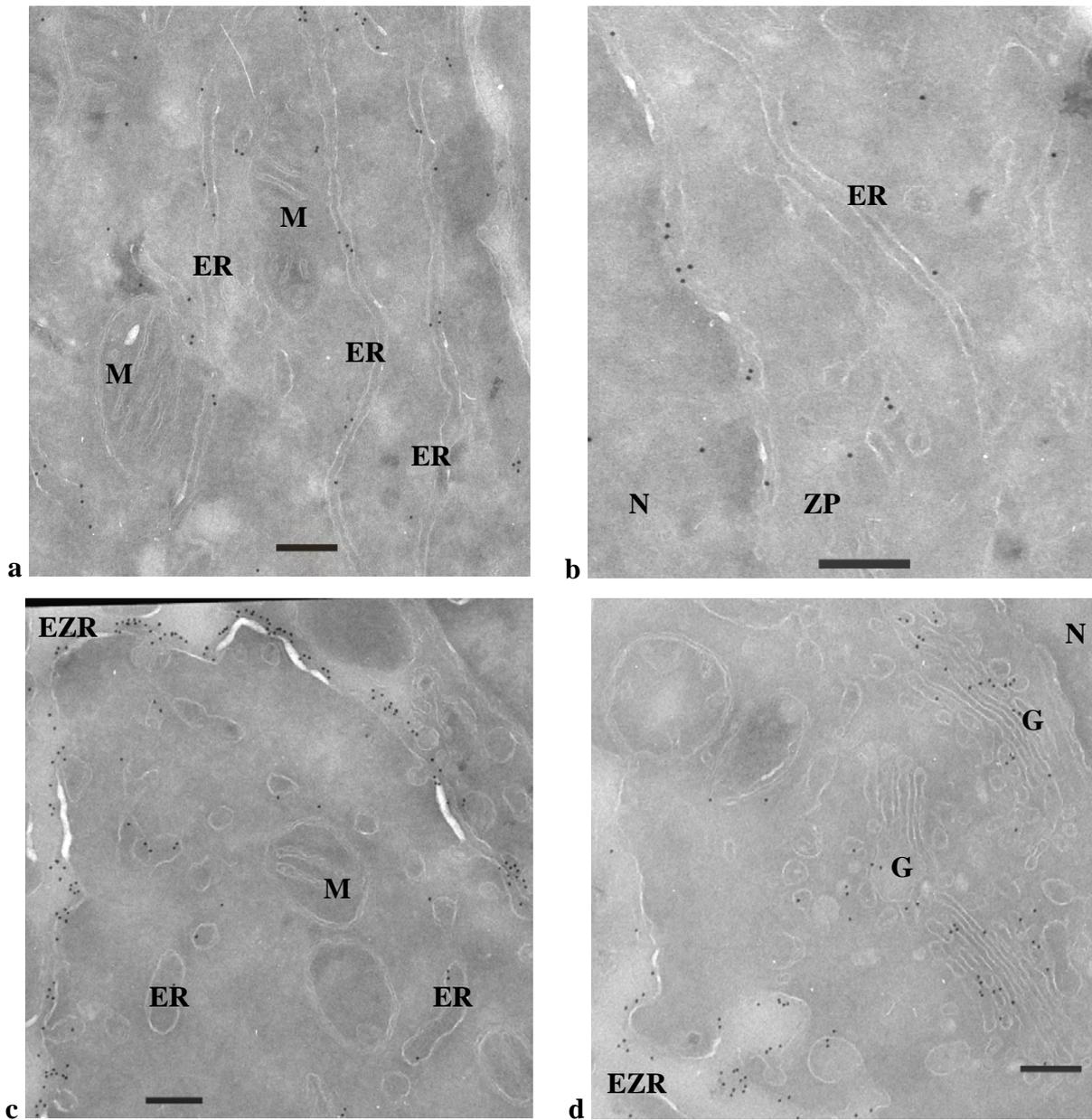


Abb. 23: Nachweis von E2 im Tet-on System in der IEM an Kryodünnschnitten.

Zellen 24 h p. ind., Ak antiE2 (SCR60), Brücken-Ak Kan. antiMaus IgG, Protein A Gold 10 nm. **a)** SK-6p830 Zellen, Nachweis von E2-Protein an ER-Membranen (Bild Nr. 2008) **b)** SK-6p830 Zellen, Nachweis von E2-Protein an der Kernmembran (Bild Nr. 2007) **c)** BHK-21p577 Zellen, Nachweis von E2 Protein an der Zellmembran (Bild Nr. 2003) **d)** BHK-21p577 Zellen, Nachweis von E2 Protein auf dem sekretorischen Weg (Golgi-Komplexe, Transportvesikel) und an der Zellmembran (Bild Nr. 2001). Balken entspricht 200 nm.

4.3.2.2 Markierungsversuche an verschiedenen Pestivirus-Infektionsmodellen

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war der intrazelluläre Nachweis von Pestivirusproteinen in der Ultrahistologie. Insbesondere durch Kolokalisation mit zellulären Kompartimenten sollten Erkenntnisse zur Virusmorphogenese gewonnen werden. Der Nachweis von pestiviralen Proteinen an Gefrierdünnschnitten wurde an verschiedenen Infektionsmodellen (Übersicht siehe Tab. 10) versucht. Aus den ultrahistologischen Untersuchungen zur Darstellung von Viruspartikeln (siehe Kapitel 4.2) wurden die Infektionsmodelle BVDV-2 „890“ und „Giraffe-1“ übernommen, da mit ihnen die meisten intrazellulären Viruspartikel in diesen Versuchen dargestellt werden konnten. Hinzugenommen wurden der KSPV-Stamm „Alfort-Tüb“ und KSPV „Alfort-Tüb-JIV“, da für den Nachweis von KSPV-Proteinen eine große Auswahl an Antikörpern im Institut zur Verfügung stand. KSPV „Alfort-Tüb-JIV“ beinhaltet eine Insertion von „JIV“ (cellular J-domain protein interacting with viral protein) des BVDV-1 „cp8“ (Müller *et al.*, 2003) zwischen dem N^{Pro} und dem Kapsidgen des KSPV-Stammes „Alfort“. In Zellkultur kommt es durch die Insertion zum Auftreten eines zpE (Gallei *et al.*, 2008). KSPV „Alfort-Tüb-JIV“ wurde in die Reihe der Infektionsmodelle aufgenommen, da es sich durch eine hohe Replikation und hohe Virustiter bei Vermehrung in Zellkultur auszeichnet.

Tab. 10: Pestivirus-Infektionsmodelle für die Immunultrahistologie (TOKUYASU-Technik).

Pestivirus	Zelllinie	Zeitpunkt der Fixierung nach Infektion
BVDV-2 „890“	MDBK	13 h, 24 h
„Giraffe-1“	MDBK	13 h
KSPV „Alfort-Tüb“	PK-15	12 h, 24 h
KSPV „Alfort-Tüb-JIV“ (BVDV „cp-7“ JIV-Insertion)	SK-6	12 h

An den Modellen wurde eine breite Palette am Institut für Virologie zur Verfügung stehender Antikörper getestet. Alle Antikörper wurden zunächst auf infizierten Zellen (Infektion mit den in der Studie verwendeten Pestiviren) im indirekten Immunfluoreszenztest überprüft (siehe Tab. 11).

Tab. 11: Übersicht zum getesteten Reaktionsspektrum der verfügbaren Antikörper im IIFT.
 + = Fluoreszenzsignal im Zytoplasma; - = keine Fluoreszenz; * = Signal nur schwach über Hintergrundsignal

Antikörper- bezeichnung	gerichtet gegen	BVDV-1 „NADL“	BVDV-2 „890“	Pestivirus „Giraffe-1“	KSPV „Alfort- Tüb“	KSPV „Alfort-Tüb- JIV“	Nicht infizierte Zellen
3H5	N ^{pro}	-	-	-	-	-	-
13B6	N ^{pro}	-	-	-	-	+	-
GRS-C3	Core	+	+	+	-	-	-
GRS-C1	Core	-	-	-	+	+	-
50F4	E ^{rns}	+	+	+	+	-	-
24/16	E ^{rns}	-	-	-	+	-	-
Kan α E ^{rns}	E ^{rns}	+	+	+	+	+	-
8F2#1	E1	+	+	+	+*	+*	(+)
SCR25	E2	+	+	+	-	-	-
SCR48	E2	+	-	+	-	-	-
SCR60	E2	+	+	+	-	-	-
SCR95	E2	+	+	+	-	-	-
SCRpool (25, 48, 60, 95)	E2	+	+	+-	-	-	-
SCR4	E2	-	+	-	-	-	-
Kan α E2	E2	+*	+*	+*	+	+	+
A18	E2	-	-	-	+	+	-
D5	E2	+	+	+	+	+	-
1b31	E2	-	+	+	-	-	-
F48	E2	+	-	-	+	+	-
9D11	NS2	+	+*	+	+*	+*	(+)
Code1/4/7(Pool)	NS3	+	+	+	+	+	-
10E10	NS4A	+	+	+	+	+	-
4B7	NS4A	+	+	+	+	+	-
3B10	NS5A	-	-	+	+	+	-
6D2	NS5B	-	-	-	-	-	-
2NB2, P4G11,	BVDV	+	-	+	+	+	-

Antikörper- bezeichnung	gerichtet gegen	BVDV-1 „NADL“	BVDV-2 „890“	Pestivirus „Giraffe-1“	KSPV „Alfort- Tüb“	KSPV „Alfort-Tüb- JIV“	Nicht infizierte Zellen
P4A11							
N2B12, INB5, PID8	BVDV	-	+	-	-	-	-
P3F6	BVDV	-	-	-	-	-	-
J2	dsRNS	Ak nicht in IIFT getestet					
αPDI „Stressgene“	PDI	+	+	+	+	+	+
αPDI „Sigma“	PDI	+	+	+	+	+	+

Nach positivem Ergebnis im IIFT wurden die Antikörper in der IEM eingesetzt, auf ihre Detektionseigenschaften getestet und die geeignete Verdünnung über Verdünnungsreihen ermittelt. Eine vollständige Übersicht der in der IEM eingesetzten Antikörper findet sich in Tab. 13 auf Seite 106.

Um die Lokalisation im ER von in der IEM nachgewiesenen Pestivirusproteinen zu verifizieren, wurden Doppelmarkierungen mit dem ER Marker PDI durchgeführt. PDI (Protein Disulfid Isomerase) ist ein Enzym, das im Lumen des ER vorkommt und den Austausch von Disulfid-Brücken an entstandenen Proteinen katalysiert. Es besitzt ein C-terminales ER-Retentionssignal (KDEL) und ist als ER-Marker anerkannt. Bei dem für diese Arbeit verwendeten Markierungsprotokoll war eine Doppelmarkierung von pestiviralen Proteinen und PDI nur möglich, da ein Ak gegen PDI aus Kaninchen zur Verfügung stand und in Frage kommende Pestivirus-Ak aus der Maus stammten. Die Unterscheidung erfolgte über die Bindung des Protein A an unterschiedliche Goldgrößen, wobei das häufiger vorkommende Antigen (PDI) über 15 nm Gold (mit geringerer Bindungseffizienz) und das seltener vorkommende Antigen (Pestivirusproteine) über 5 nm Gold (mit höherer Bindungseffizienz) nachgewiesen wurde.

Ein positives Signal bei der Verwendung von 5 nm Gold war gekennzeichnet von Ansammlungen vieler Goldpartikel. Im Gegensatz dazu bestand ein positives Signal bei der Verwendung von 15 nm Gold meist aus einem einzelnen Partikel, da weitere Bindungen aufgrund der Goldgröße verhindert wurden.

Der Einzelnachweis von PDI über 10 nm Gold führte hingegen zu Ansammlungen von mehreren Goldpartikeln im ER Lumen (Bilder nicht gezeigt). In den folgenden Kapiteln wird im einzelnen auf die intrazellulären Verteilungsmuster der in der IEM nachgewiesenen Pestivirusproteine eingegangen.

Virionen waren am besten in Präparaten darstellbar, die nicht markiert, sondern direkt kontrastiert wurden. Abb. 24 a und b zeigen Pestivirionen aus dem Infektionsmodell „Giraffe-1“/MDBK 13 h p. i. in kleinen Vesikeln. In Abb. 24 c sind vermutlich mehrere VPs im ER Lumen dargestellt, bei einem scheint das dunkel kontrastierte Kapsid nicht vollständig von der Hüllmembran umgeben zu sein. Ob es sich dabei um „Budding“ an der ER-Membran handelt, kann anhand dieses Bildes nicht eindeutig geklärt werden.

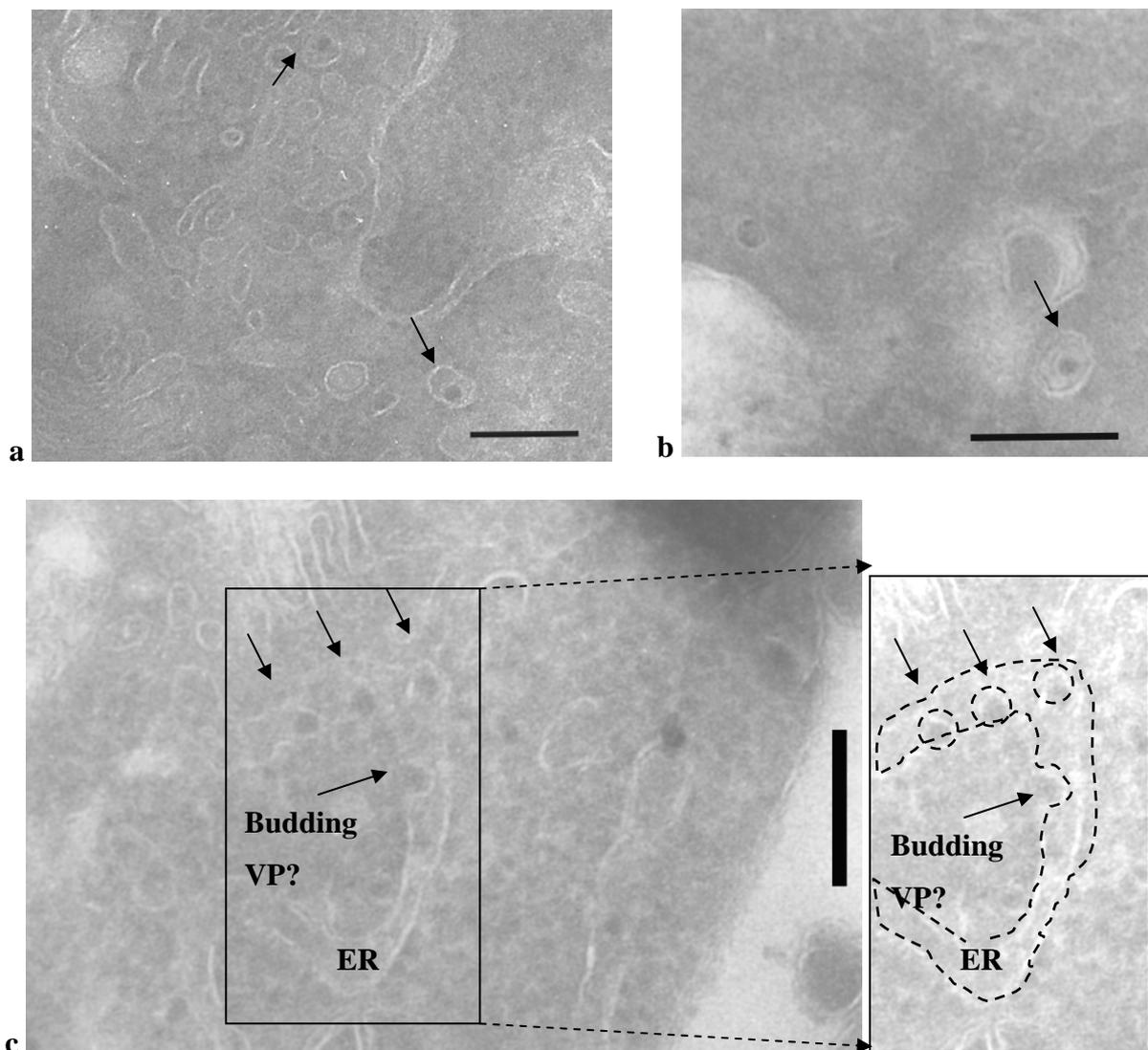


Abb. 24: Darstellung von Pestivirionen in Gefrierschnitten nach TOKUYASU.

a) und b): VPs in kleinen Vesikeln in der Nähe der Plasmamembran. c) Mehrere VPs im ER Lumen. Mögliches „Budding“ eines VPs an Bildausschnitt skizziert. Pfeile zeigen auf VPs. Balken entspricht 200 nm (Bild Nrn. 1439, 1448, 1443).

4.3.2.2.1 Nachweis des Kapsidproteins in der IEM an Kryodünnschnitten

Der Nachweis des Kapsidproteins in der IEM an Kryodünnschnitten gelang für die Infektionsmodelle BVDV-2 „890“ 13 h bzw. 24 h p. i. (Häufigkeit: +) und für das Infektionsmodell „Giraffe-1“ 13 h p. i. (Häufigkeit: ++) mit dem mAk „GRS-C3“. Die Markierungen zeichneten sich durch eine punktuelle Anhäufung von Goldpartikeln an verschiedenen Stellen im Zytoplasma, teilweise an Membranen des ERs sowie auch im Lumen von MVKs und teilweise an nicht genauer bestimmbareren Lokalisationen im Zytoplasma aus (siehe Abb. 25). Weiterhin wurden extrazelluläre Markierungen gefunden, wobei es sich wahrscheinlich um die Detektion von VPs handelt. An Stellen mit starker Markierung war allerdings die Identifizierung von Viruspartikeln nicht mehr eindeutig möglich. Die Assoziation zum ER Lumen konnte durch Kolokalisation mit dem ER-Marker PDI über Doppelmarkierung bestätigt werden (siehe Abb. 26).

4.3.2.2.2 Nachweis des Strukturproteins E^{rns} in der IEM an Kryodünnschnitten

Der Nachweis des Strukturproteins E^{rns} in der IEM an Kryodünnschnitten gelang für das Infektionsmodell BVDV-2 „890“ 24 h p. i. mit dem mAk „50F4“ (Häufigkeit: +). Die Markierungen fanden sich im Zytoplasma innerhalb von MLKs und MVKs (siehe Abb. 27 a). Eine Markierung einzelner Viruspartikel wurde nicht beobachtet. 13 h p. i. gewonnene Präparate ließen sich mit dem gleichen Antikörper nicht markieren. Der Nachweis des E^{rns} gelang weiterhin für das Infektionsmodell KSPV „Alfort-Tüb-JIV“ mit dem mAk „24/16“. Die Markierungen befanden sich im Zytoplasma, eine genauere Lokalisierung war aufgrund der geringen Häufigkeit des Signals nicht möglich (Häufigkeit: (+)). In einem Fall konnte die Markierung allerdings direkt einem Viruspartikel in einer Vakuole an der Grenze zum Extrazellulärraum zugeordnet werden (siehe Abb. 27 b).

4.3.2.2.3 Nachweis des Strukturproteins E1 in der IEM an Kryodünnschnitten

Der Nachweis des Strukturproteins E1 gelang in der IEM an Kryodünnschnitten für die Infektionsmodelle BVDV-2 „890“ 13 h p. i., „Giraffe-1“ und KSPV „Alfort-Tüb“ 24 h p. i.; allerdings war die Markierung in allen Fällen nur schwach (Häufigkeit: (+)). Die Markierungen fanden sich an Membranen im Zytoplasma; eine ER Lokalisierung konnte für einige Markierungen postuliert werden (siehe Abb. 28, MDBK Zellen 13 h p. i. „Giraffe-1“), eine Kolokalisierung mit dem ER-Marker PDI gelang aufgrund der geringen Häufigkeit der E1 Markierung nicht. In Abb. 28 fällt neben dem E1 Nachweis am ER die Darstellung eines VP im ER Lumen auf.

4.3.2.2.4 Nachweis des Strukturproteins E2 in der IEM an Kryodünnschnitten

Der Nachweis des Strukturproteins E2 gelang in der IEM an Kryodünnschnitten für das Infektionsmodell „Giraffe-1“ mit den mAk „SCR25“ und „SCR60“ (Markierungshäufigkeit: +(+)) sowie für die KSPV-Infektionsmodelle mit dem mAk „A18“ (Häufigkeit: +++). Die Markierungen fanden sich in den meisten Fällen an schlauchartigen Membranstrukturen, deren Topologie dem ER entsprach. Diese Lokalisation konnte durch eine Doppelmarkierung mit dem ER-Marker-Ak (antiPDI „Stressgene“) bestätigt werden. Einzelne im Schnitt dargestellte Virionen wurden von den Antikörpern nicht markiert. Ausgewählte Bilder zum E2-Nachweis sind in Abb. 29 dargestellt. Bild a) zeigt eine Übersicht einer mit KSPV „Alfort-Tüb-JIV“ infizierten SK-6 Zelle 12 h p. i.; Bereiche mit E2 Protein Nachweis sind hervorgehoben. Bild b) zeigt einen Detailausschnitt derselben Zelle mit ausgeprägter Goldmarkierung (10 nm) entlang intrazellulärer Membranen. In Bild c) ist ein Ausschnitt einer anderen Zelle mit intensiver E2-Markierung zu sehen, wobei nicht nur zelluläre Membranen, sondern auch MVKs markiert sind. Abb. 30 zeigt das Ergebnis einer Doppelmarkierung mit dem ER-Marker PDI an Zellschnitten desselben Ursprungs; E2 Protein wurde über 5 nm Gold nachgewiesen und PDI über 15 nm Gold. Es konnte eine Kolokalisation der beiden Proteine gezeigt werden.

4.3.2.2.5 Nachweis der Nicht-Strukturproteine in der IEM an Kryodünnschnitten

Der Nachweis diverser Nicht-Strukturproteine (N^{Pro}, NS2, NS3, NS4A, NS5A, NS5B) wurde mithilfe verschiedener am Institut für Virologie zur Verfügung stehender Antikörper versucht. Es konnte jedoch keine Markierung mit den verwendeten Infektionsmodellen erreicht werden, obwohl die Antikörper in der Vortestung im IIFT zum Teil für einen Proteinnachweis gut geeignet waren.

4.3.2.2.6 Nachweis von Doppelstrang RNS in der IEM an Kryodünnschnitten

Doppelstrang-RNS entsteht u. a. bei der Replikation des Genoms von Pestiviren und ist ein Marker für die Lokalisation viraler Replikationskomplexe. Der Nachweis von Doppelstrang RNS in der IEM an Kryodünnschnitten gelang für das Infektionsmodell BVDV-2 „890“ 13 h und 24 h p. i. (Häufigkeit: +) und für das Infektionsmodell „Giraffe-1“ 13 h p. i. (Häufigkeit: ++) mit dem mAk „J2“. Die Markierungen zeichneten sich durch starke punktuelle Anhäufung von Goldpartikeln entweder frei im Zytoplasma oder aber meist in MVKs oder an der MVK Membran aus (siehe Abb. 31).

Bei einer Doppelmarkierung mit dem ER Marker PDI konnte keine Kolokalisation gezeigt werden (Bilder nicht gezeigt). Für das Infektionsmodell „Giraffe-1“ konnten dsRNS-Markierungen vereinzelt auch extrazellulär zwischen den Zellen gefunden werden.

4.3.2.2.7 Zusammenfassung der IEM Ergebnisse an Gefrierdünnschnitten

Mithilfe der etablierten Gefriereinbettung nach TOKUYASU ist es erstmalig gelungen, Pestivirusproteine ultrahistologisch unter Einsatz verschiedener Zellkultur-Infektionsmodelle nachzuweisen. Die gute Erhaltung und Darstellung der Zellmorphologie erlaubten meist eine klare Zuordnung der Markierung zu bestimmten Zellkompartimenten. Eine Lokalisation im ER konnte über Kolokalisationsstudien mit dem ER-Marker PDI verifiziert werden.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Markierungsversuche tabellarisch zusammengefasst. In Tab. 12 finden sich in Stichworten die Befunde zur intrazellulären Lokalisation der markierten Antigene und in Tab. 13 das Reaktionsspektrum und die Verwendbarkeit der eingesetzten Primär-Ak. Bei einem Vergleich mit den Ergebnissen aus dem IIFT fällt auf, dass von den Antikörpern, die zum Nachweis diverser Pestivirusproteine im IIFT geeignet sind, nur wenige ein spezifisches Signal in der IEM erbrachten.

Tab. 12: Infektion mit Pestiviren: Ergebnisse der IEM an Gefrierdünnschnitten von mit Pestiviren infizierten Zellen.

Antigen	Ergebnis der Immunmarkierung an Gefrierdünnschnitten
Kapsidprotein	Frei im Zytoplasma, assoziiert mit ER Membranen, im ER Lumen und kleinen Vesikeln, vereinzelt extrazellulär (VPs?)
E ^{rns}	In MVKs/ MLKs (nur zu späten Zeitpunkten, 24 h p. i.), vorher nicht nachweisbar
E1	Hauptsächlich assoziiert mit ER Membranen, in der Zelle gleichmäßig verteilt
E2	Hauptsächlich assoziiert mit ER Membranen, in der Zelle gleichmäßig verteilt, auch in MVKs
N ^{Pro} , NS2, NS3, NS4A, NS5A, NS5A	Keine Markierung durch die vorhandenen Antikörper
dsRNS	Zytoplasma, v. a. in MVKs, keine Kolokalisation mit ER-Marker, vereinzelt extrazellulär

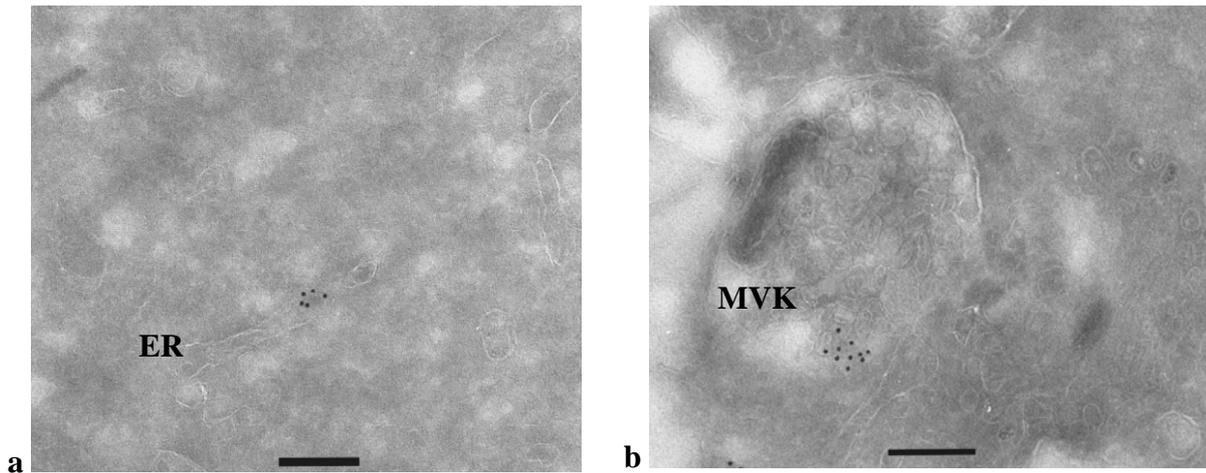


Abb. 25: Nachweis des Kapsidproteins in der IEM an Kryodünnschnitten.

„Giraffe-1“ inf. MDBK-Zellen 13 h p. i.. Nachweis des Kapsidproteins im ER Lumen (a) und in MVK (b) über mAk antiC (GRS-C3), BrAk Kan. antiMaus IgG, Protein A 10 nm Gold (Bild Nrn. 1957, 1953). Balken entspricht 200 nm.

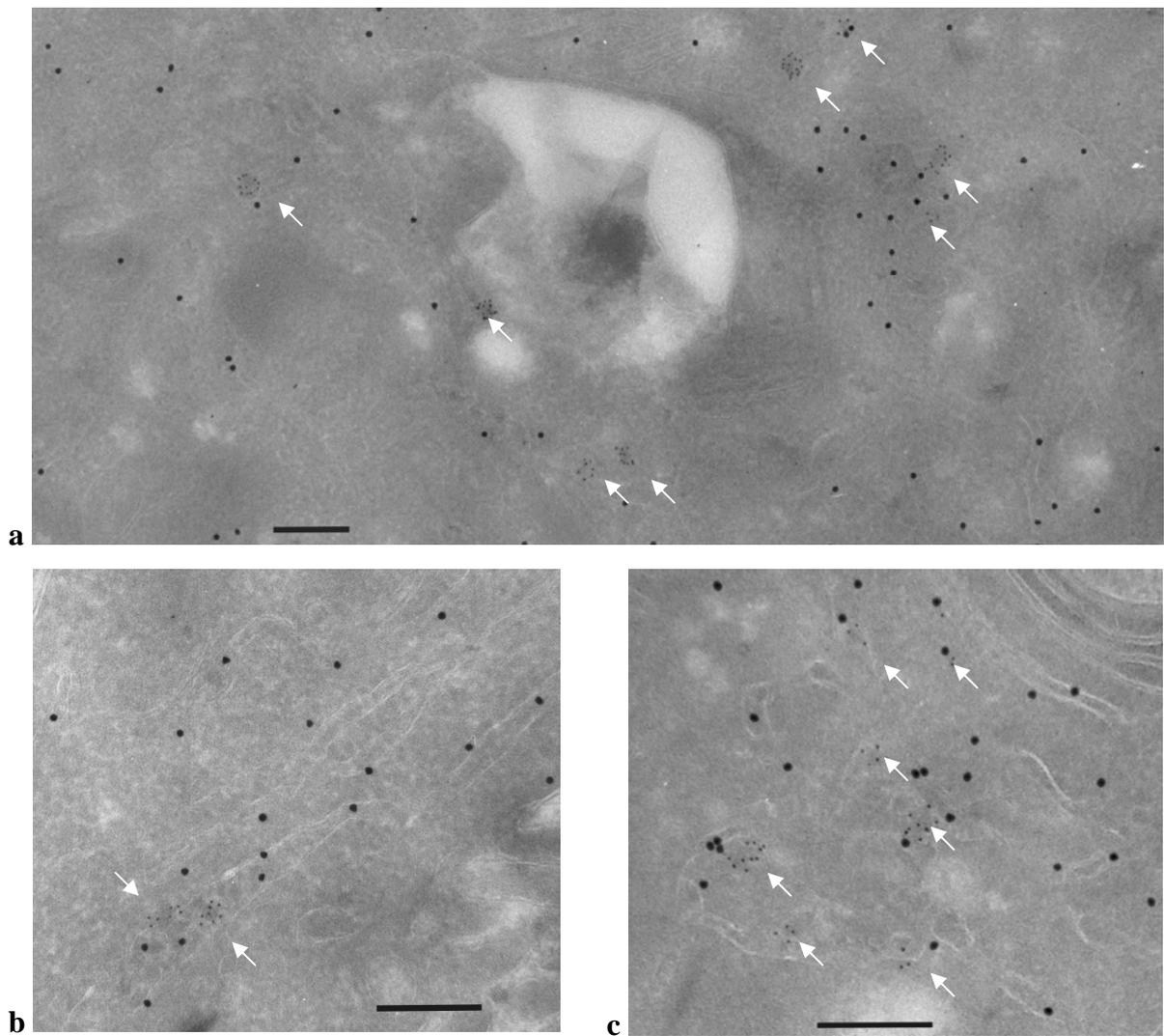


Abb. 26: Kolokalisation des Kapsidproteins mit ER-Marker PDI.

„Giraffe-1“ inf. MDBK-Zellen 13 h p. i.. Nachweis des Kapsidproteins (weiße Pfeile) und Kolokalisation mit dem ER-Marker PDI, mAk antiC (GRS-C3), BrAk Kan. antiMaus IgG, Protein A 5

nm Gold und Kan. antiPDI (Stressgene), Protein A 15 nm Gold (Bild Nrn. 3137, 3139, 3140). Balken entspricht 200 nm.

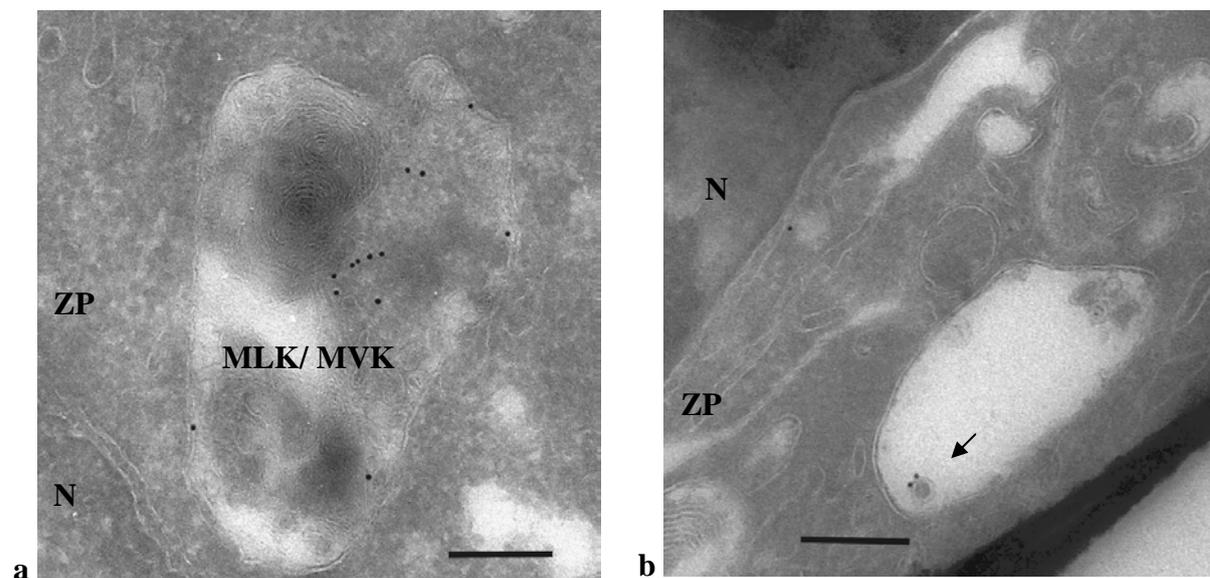


Abb. 27: Nachweis des Strukturproteins E^{tns} in der IEM an Kryodünnschnitten.

a) BVDV-2 „890“ inf. MDBK-Zellen 24 h p. i. E^{tns} Nachweis in MLK über mAk anti E^{tns} (50F4), BrAk Kan. antiMaus IgG, Protein A 10 nm Gold (Bild Nr. 2343). b) KSPV „Alfort-Tüb-JIV“ 12 h p. i. E^{tns} Nachweis an VP (Pfeil), mAk anti E^{tns} (24/16), BrAk Kan. anti Maus IgG, Protein A 10 nm Gold (Bild Nr. 3467). Balken entspricht 200 nm.

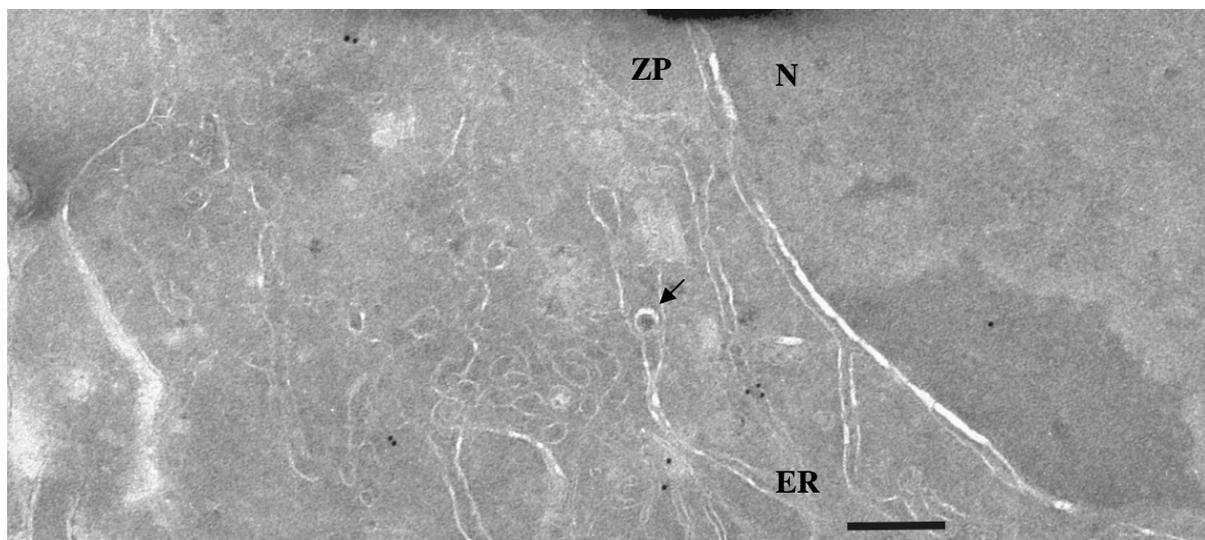


Abb. 28: Nachweis des Strukturproteins E1 in der IEM an Kryodünnschnitten.

„Giraffe-1“ IgG MDBK Zellen 13 h p. i. Nachweis des E1 Proteins an ER Membranen über mAk antiE1 (8F21), BrAk Kan. anti Maus IgG, Protein A 10 nm Gold (Bild Nr. 2781). Pfeil deutet auf VP in ER Lumen. Balken entspricht 200 nm.

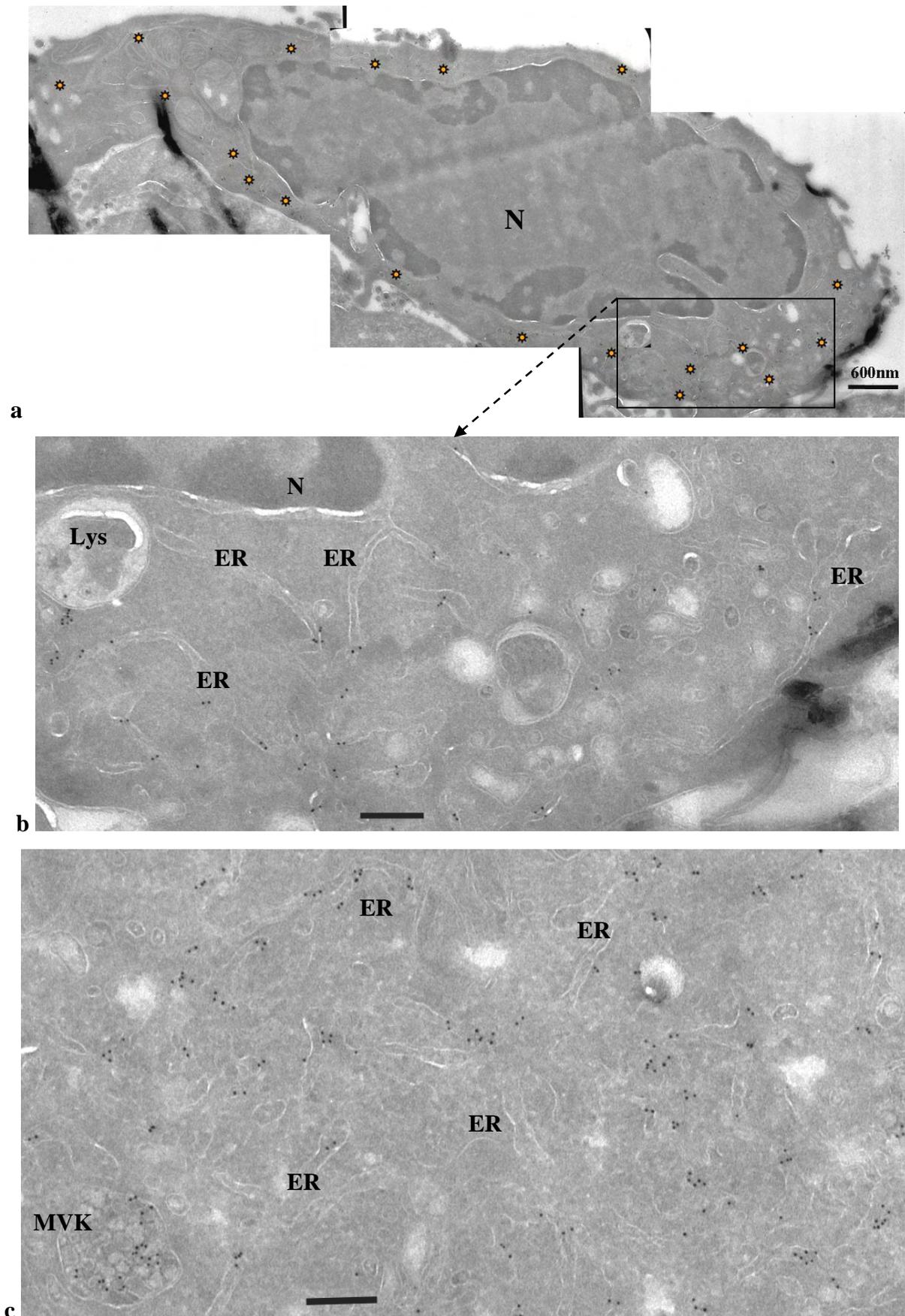


Abb. 29: Nachweis des E2 Strukturproteins in der IEM an Kryodünnschnitten.
 KSPV „Alfort-Tüb-JIV“ inf. SK-6 Zellen 12 h p. i.. Nachweis von E2, mAk antiE2 (A18), BrAk Kan. anti Maus, Protein A 10 nm Gold. (a) Übersicht eines Zellanschnitts; in mit Sternen gekennzeichneten

Bereichen liegt eine Goldmarkierung vor. **(b)** (Detailausschnitt aus a) und **(c)** zeigen starke Immunogoldmarkierung an ER Membranen (Bild Nrn. 3371-73 (a und b), 3369 (c)). Balken entspricht 200 nm (nur b, c).

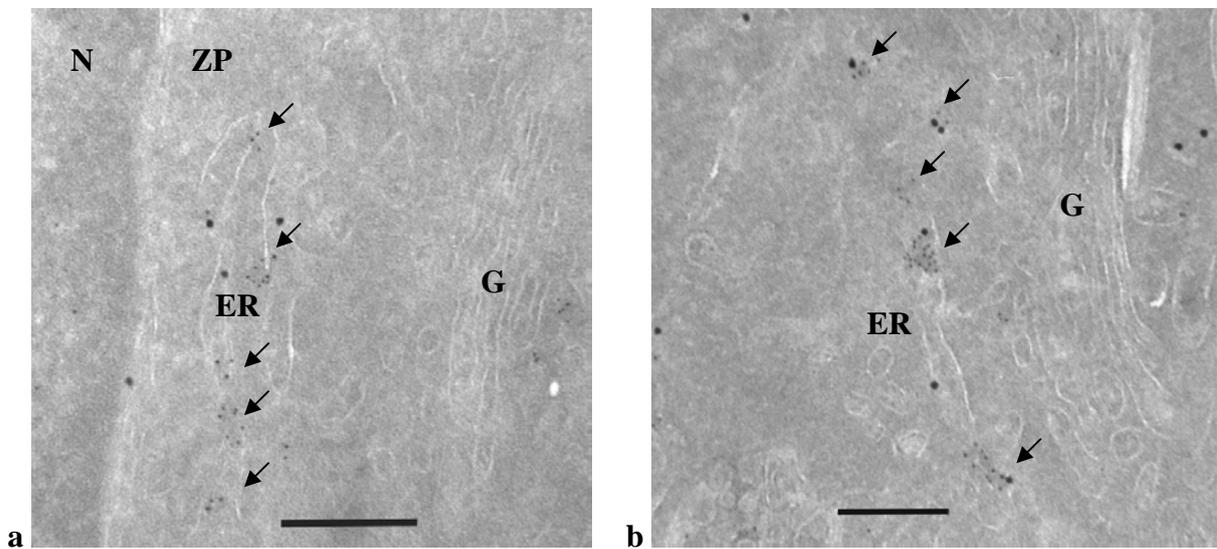


Abb. 30: Kolokalisation des Strukturproteins E2 mit ER-Marker PDI.

KSPV „Alfort-Tüb-JIV“ inf. SK-6 Zellen 12 h p. i. Nachweis der Kolokalisation von E2 mit ER-Marker PDI über mAk antiE2 (A18) BrAk Kan. antiMaus IgG, Protein A 5 nm Gold und Kan. antiPDI IgG (Stressgen), Protein A 15 nm Gold (Bild Nrn. 3474, 3476). Pfeile zeigen auf E2-Markierung. Balken entspricht 200 nm.

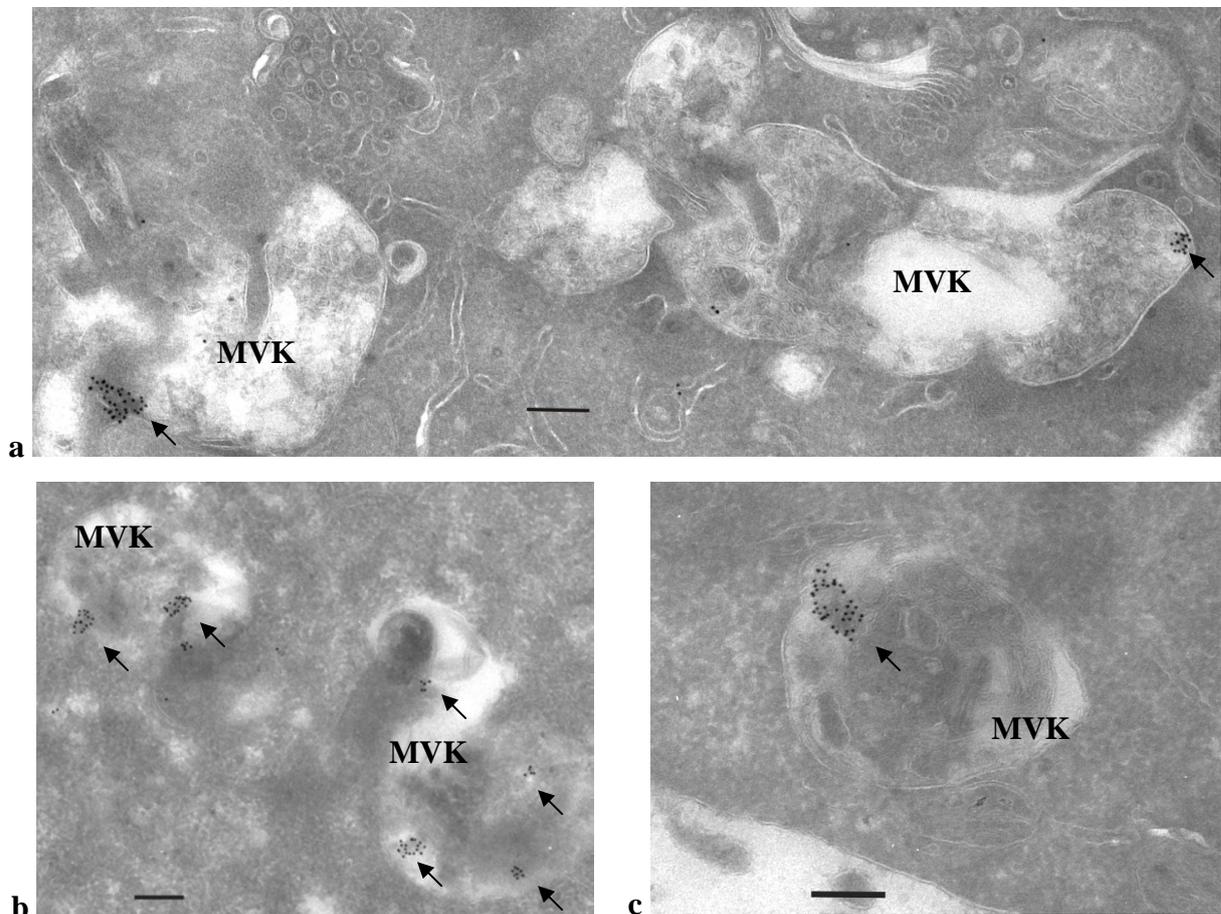


Abb. 31: Nachweis von Doppelstrang RNS in der IEM an Kryodünnschnitten.

„Giraffe-1“ inf. MDBK-Zellen 13 h p. i. Nachweis von Doppelstrang RNS (schwarze Pfeile) in MVKs über mAk anti-dsRNS (J2), BrAk Kan. anti Maus IgG, Protein A 10 nm Gold (Bild Nrn. 2780 (a), 2770 (b), 2772 (c)). Balken entspricht 200 nm.

Tab. 13: Übersicht zum Reaktionsspektrum der in der IEM eingesetzten Antikörper.

☐+ = Ak bindet; + → +++ = Aussage über Intensität und Häufigkeit des Signals, ☐- = kein Signal über Hintergrundmarkierung, coPDI = Kolokalisation mit PDI in Doppelimmunmarkierung; n. d. = nicht durchgeführt ☐/- = Ag/ Ak Kombination bereits negativ in IIFT, daher nicht durchgeführt.

Antikörper Bezeichnung	gerichtet gegen	eingesetzte Verdünnung	BVDV-2 "890" 13 h p. i.	BVDV-2 "890" 24 h p. i.	„Giraffe-1“ 13 h p. i.	KSPV "Alfort-Tüb" 12 h p. i.	KSPV "Alfort-Tüb" 24 h p. i.	KSPV "Alfort-Tüb- JIV" 12 h p. i.
3H5	N ^{pro}	1:100	/	/	-	/	/	/
13B6	N ^{pro}	1:100	/	/	-	/	/	/
GRS-C3	Core	1:5-50	+	+	++, coPDI	/	/	/
GRS-C1	Core	1:5	/	/	/	-	-	-
Kan αE ^{rms}	E ^{rms}	1:50- 500	-	-	-	-	-	-
50F4	E ^{rms}	1:10	-	+	-	-	-	-
24/16	E ^{rms}	1:10	/	/	/	-	-	(+)
8F2#1	E1	1:20	(+)	-	(+)	-	(+)	-
SCR25	E2	1:20	-	n. d.	+(+)	/	/	/
SCR48	E2	1:20	/	/	-	/	/	/
SCR60	E2	1:10-50	-	n. d.	+(+), coPDI	/	/	/
SCR95	E2	1:20	-	n. d.	-	/	/	/
SCR4	E2	1:10	-	-	/	/	/	/
SCRpool (8, 25, 48, 60, 95)	E2	1:10-50	n. d.	n. d.	+(+)	/	/	/
A18	E2	1:20	/	/	/	++	+++, coPDI	+++, coPDI
D5	E2	1:20	-	-	-	-	-	-
1b31	E2	1:100	-	-	-	/	/	/

Antikörper Bezeichnung	gerichtet gegen	eingesetzte Verdünnung	BVDV-2 "890" 13 h p. i.	BVDV-2 "890" 24 h p. i.	„Giraffe -1“ 13 h p. i.	KSPV "Alfort-Tüb" 12 h p. i.	KSPV "Alfort-Tüb" 24 h p. i.	KSPV "Alfort-Tüb- JIV" 12 h p. i.
F48	E2	1:50	/	/	/	-	-	-
Kan αE2	E2	1:500	-	-	-	-	-	-
9D11	NS2	1:10	-	-	-	-	-	-
Code1, 4, 7 (Pool)	NS3	1:20	-	-	-	-	-	-
10E10	NS4A	1:100	-	-	-	-	-	-
4B7	NS4A	1:50	-	-	-	-	-	-
3B10	NS5A	1:50	/	/	-	-	-	-
6D2	NS5B	1:1000	/	/	-	/	/	/
Pool: 2NB2, P4G11, P4A11	BVDV	1:50	/	/	-	-	-	-
J2 (dsRNS)	dsRNS	1:1000	+	+	++	-	-	-
αPDI (Stressgen)	PDI	1:50- 500	n. d.	n. d.	++	n. d.	+++	+++
αPDI (Sigma)	PDI	1:500	n. d.	n. d.	-	n. d.	n. d.	n. d.

5 Diskussion

5.1 Einsatz verschiedener EM-Einbettungstechniken für die Untersuchungen zur Pestivirusmorphogenese

In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Einbettungsverfahren für Kulturzellen eingesetzt. Die Einbettungsmethoden Epoxidharz, „LR-Gold“ Acrylharz und Gefriereinbettung führten zu unterschiedlichen Darstellungen der Zellmorphologie, insbesondere von Membranen. Abb. 32 zeigt dies am Beispiel von Membranen des ER. Bei Einbettung in Epoxidharz wurden Membranen dunkel kontrastiert (durch die Verwendung von OsO_4), bei der „LR-Gold“-Einbettung schwach bzw. gar nicht, und nach TOKUYASU Gefriereinbettung hoben sie sich hell gegen das Zytoplasma ab.

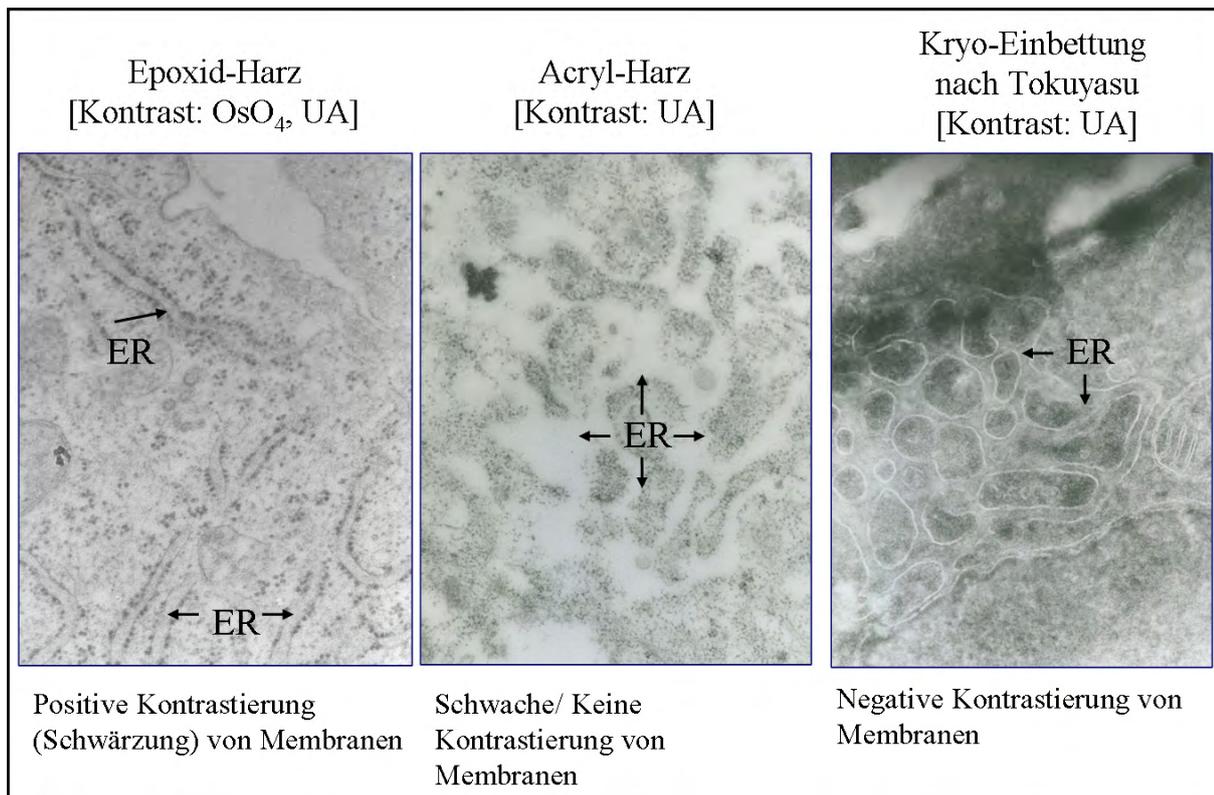


Abb. 32: Darstellung von Membranen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) nach unterschiedlichen Einbettungen.

OsO_4 = Osmiumtetroxid, UA = Uranylacetat

Die Einbettung in Epoxidharze eignete sich am besten für morphologische Untersuchungen, während Einbettungen in Acrylharze durch die ungenügende Darstellung von Membranen und starkes Aufquellen der Zellen hierfür nicht in Frage kamen. Es stellte sich heraus, dass die Gefriereinbettung nach TOKUYASU prinzipiell für morphologische Untersuchungen gut

geeignet ist, allerdings schwankten Auflösung und Kontrast von Präparation zu Präparation und die Identifizierung des rER war durch fehlende Schwärzung von Ribosomen gelegentlich erschwert. Eine Immunogoldmarkierung der Schnitte führte durch die Behandlung mit Blockingreagenzien und durch mehrere Waschstufen im Vergleich zu nativen Präparaten stets zu geringfügigen Einbußen in der Morphologiedarstellung.

Für die Immunogoldmarkierungen waren die Acrylharzeinbettungen ebenfalls weniger geeignet. Mit dem verwendeten Markierungsprotokoll wurden deutlich schwächere Markierungsintensitäten erreicht als bei der Immunmarkierung an Kryoschnitten; außerdem wurde die Zuordnung der Markierungen zu bestimmten Strukturen oder Kompartimenten durch die ungenügende Darstellung von Membranen erschwert. Sowohl die Acrylharzeinbettung als auch die Methode nach TOKUYASU wurden im Rahmen dieser Arbeit am Institut für Virologie etabliert. Dabei zeigte sich, dass die TOKUYASU-Technik nur einen etwas erhöhten apparativen Aufwand für die Anfertigung der Gefrierdünnschnitte und für die Lagerung der Probenblöcke in flüssigem Stickstoff als Nachteile mit sich bringt, so dass nach einer Einarbeitungsphase alle Markierungsversuche an pestivirusinfizierten Zellen mit dieser Methode durchgeführt werden konnten. Diese Technik vereint nach eigener Erfahrung eine relativ einfache Probenpräparation mit einer guten Darstellung der zellulären Morphologie sowie einer guten Erhaltung und Zugänglichkeit der Antigene. Wie in der Arbeit von *Griffith und Posthuma, 2002* beschrieben, ist es möglich, angefertigte Schnitte vor der Immunmarkierung ohne Verlust der Antigenität mehrere Wochen im Kühlschrank aufzubewahren.

Als wichtige Parameter für die Markierung und Kollokalisierung von Antigenen stellten sich heraus:

- **Bindungsaffinität der Primär-Ak:** Nur ein geringer Anteil der erfolgreich in der indirekten Immunfluoreszenz eingesetzten Antikörper führte bei der Immunogoldmarkierung von Gefrierdünnschnitten zu einem positiven Ergebnis. Dieses Phänomen wird von EM- Arbeitsgruppen häufig beobachtet (*Griffiths, 2004; W. Möbius, MPI Göttingen, D. Zeuschner, MPI Münster, persönliche Mitteilungen*). Bei den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen zum Pestivirusproteinnachweis an infizierten Zellen muss bedacht werden, dass unterschiedlich viele Antikörper für den Nachweis der einzelnen Proteine zur Verfügung standen (z. B. ein Antikörper gegen E1, zehn Antikörper gegen E2), und dass die Eignung dieser Antikörper für Immun-EM sehr verschieden war. Ähnliche Beobachtungen wurden bei der Auswahl von Antikörpern zum Nachweis zellulärer Markerproteine gemacht. Insgesamt wurden sieben verschiedene Antikörper

zum Nachweis von ER Marker-Proteinen (PDI, KDEL-Motiv, Calnexin) getestet (davon sechs kommerzielle Ak, Daten nicht gezeigt), wovon schließlich nur ein PDI-Ak für die Kolokalisationsstudien geeignet war.

- **Zugänglichkeit der Antigene:** Im Rahmen der durchgeführten Markierungen fiel auf, dass z. B. die Markierung von E2 an ER-Membranen mit mehreren Antikörpern an unterschiedlichen Infektionsmodellen gut gelang, jedoch nicht an intrazellulären oder extrazellulären Virionen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die erschwerte Zugänglichkeit der antigenen Domäne nach dem Einbau des Proteins in das Virion, so dass der Antikörper nicht mehr mit der gleichen Effizienz daran binden kann. Zu Beginn der Markierungsversuche wurde erwartet, dass die in den ultrahistologischen Studien nachgewiesenen Virionen mittels Immunogold an Gefrierschnitten leicht zu markieren sind. Es gelangen allerdings nur wenige Aufnahmen von markierten Virionen, die als solche auch erkennbar waren. Ein möglicher Grund hierfür wird mittels Abb. 33 erläutert: Eindeutig erkennbare Virionen befinden sich meist vollständig innerhalb eines Kryoschnittes (Dicke ca. 80 - 100 nm), so dass sie zwar gut abgebildet werden, die Antikörper und das Protein A gekoppelte Gold allerdings nicht daran binden können. Angeschnittene Virionen, die an der Oberfläche des Schnittes liegen, werden hingegen markiert, allerdings ist bei diesen Viruspartikeln die typische Morphologie nicht optimal unter der Markierung erkennbar. Die gleiche Aussage gilt auch für zelluläre Strukturen und Organellen, die in den Schnitten enthalten sind.

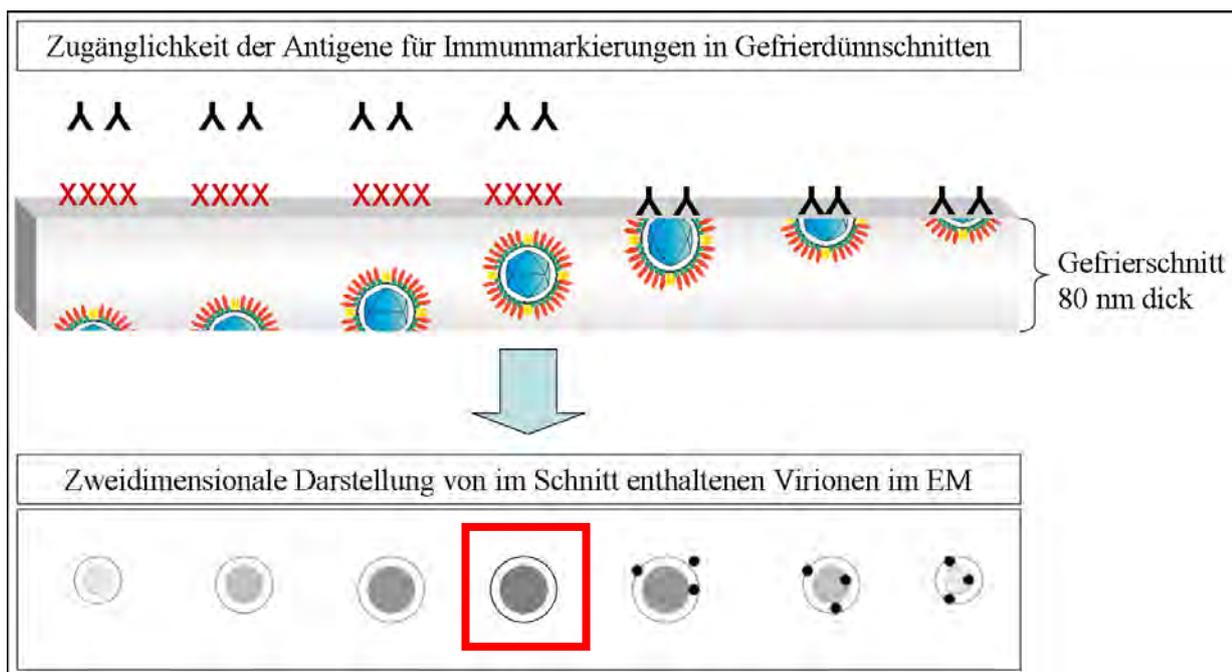


Abb. 33: Zugänglichkeit viraler Antigene im Kryoschnitt und Darstellung der Virionen im EM.

- **Antikörperkombination für Doppelmarkierungen:** Zur Durchführung von Doppelmarkierungen nach dem hier angewandten Protokoll musste einer der beiden Primär-Ak aus dem Kaninchen stammen (direkte Bindung an Protein A Gold). Da alle „funktionierenden“ Antikörper gegen Pestivirusproteine und gegen dsRNS aus der Maus kamen, waren Kolokalisationsversuche mit zwei Antikörpern gegen unterschiedliche Pestivirusproteine oder z. B. E^{rns} und dsRNS nicht möglich. Leider gelang es während des Projekts nicht, weitere Antikörper zum Nachweis anderer zellulärer Markerproteine (für endosomales Kompartiment, für Transportvesikel und Golgi-Netzwerk) erfolgreich zu testen. Bei der Suche nach einem geeigneten ER-Marker wurden bereits sieben verschiedene Antikörper ausprobiert. Für die zukünftige Auswahl weiterer Marker-Antikörper sollte auf Empfehlungen und Erfahrungswerte von anderen EM-Arbeitsgruppen zurückgegriffen werden.

5.2 Ultrahistologische Untersuchungen zur Morphogenese von Pestiviren

Um die Morphogenese von Viren besser zu verstehen, bieten sich ultrahistologische Studien an infizierten Zellkulturen oder Organen an. Allerdings konnten mit dieser Methode bisher kaum Aufschlüsse über den Reifungs- und Ausschleusungsprozess von Pestiviruspartikeln gewonnen werden. Es ist auffällig, dass in der Literatur kaum Berichte zur Pestivirusmorphogenese zu finden sind, während für die eng verwandten Flaviviren (Genus *Flavivirus*) zahlreiche Arbeiten existieren. Die Schwierigkeit in der ultrahistologischen Untersuchung liegt im Vergleich zu Flaviviren vor allem darin, dass bei der Pestivirusvermehrung in Zellkultur weniger infektiöse Viruspartikel je infizierter Zelle gebildet werden (verwendete Pestivirus-Infektionsmodelle: ca. 10^7 TCID₅₀/ml, siehe Tab. 4, Seite 59; bei Flaviviren: Virustiter $> 10^8$ TCID₅₀/ml, *Tajima et al., 2008*). In Abb. 34 wird der Erwartungswert für das Auffinden von Pestivirionen in Dünnschnitten infizierter Kulturzellen schematisch dargestellt. Auf der Grundlage eines Virustiters von ca. 10^8 TCID₅₀/10ml und ca. 3×10^7 MDBK Zellen in einer Kulturschale lässt sich errechnen, dass in einer Zelle weniger als 10 infektiöse Viruspartikel gebildet werden. Von einer Zelle lassen sich ca. 200 Dünnschnitte anfertigen, die im Mittel ca. 10 infektiöse Viruspartikel enthalten können. Diese grobe Näherung verdeutlicht die Schwierigkeiten, die sich bei Morphogenesestudien von Pestiviren ergeben. Die Zahl der zu erwartenden Viruspartikel liegt allerdings etwas höher, da bei dem Rechenbeispiel nur infektiöses Virus berücksichtigt wird, während unreife und defekte Virionen nicht erfasst werden.

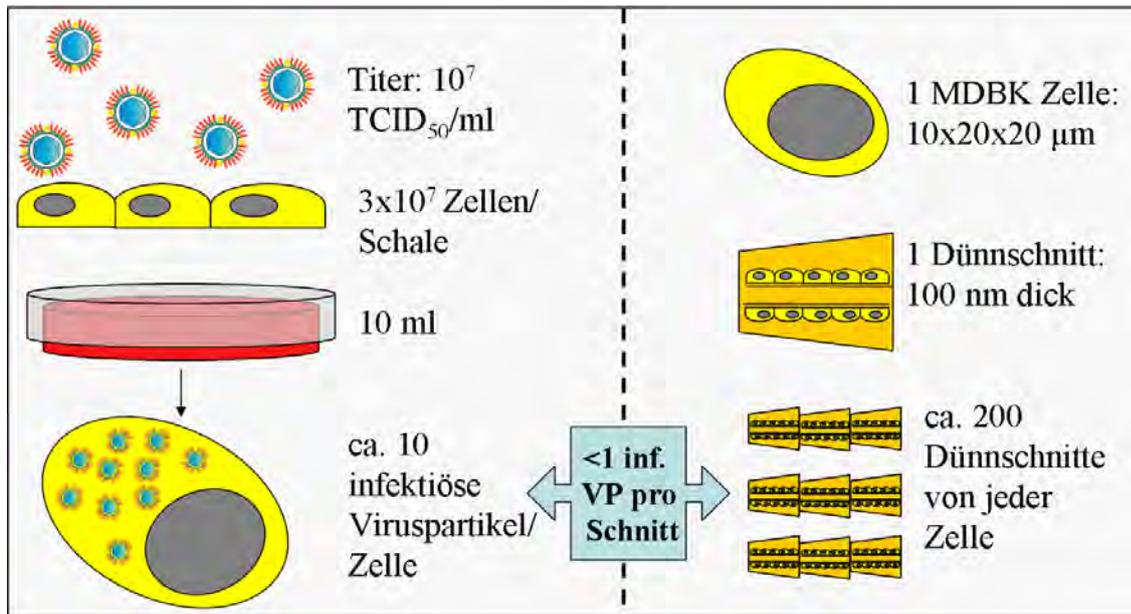


Abb. 34: Schematische Darstellung des Erwartungswertes für Virionen (VP) in Dünnschnitten.

Aufgrund des geringen Erwartungswertes für die intrazelluläre Virionenkonzentration wurde in den durchgeführten Infektionsversuchen bei der Infektion der Zellen auf die Verwendung einer hohen m. o. i. (> 1) und eine Synchronisation der Infektion Wert gelegt, um zum Zeitpunkt „0“ eine Infektion möglichst aller Zellen zu erreichen. So befanden sich bei der anschließenden elektronenmikroskopischen Auswertung annähernd alle betrachteten Zellen im gleichen Stadium der Virusvermehrung, womit die Wahrscheinlichkeit für die Beobachtung von Morphogeneseereignissen erhöht wurde.

Ziel der Untersuchungen zur Morphogenese war das Studium bestimmter Stadien während der Virusentstehung, nämlich „Budding“, Reifung, Transport. Um den gewünschten Zeitraum im Vorfeld möglichst genau einzugrenzen, wurde im ersten Teil der Arbeit bei der Etablierung der Infektionsmodelle großer Wert auf die Identifizierung des Zeitpunkts der initialen Virusfreisetzung gelegt. Infizierte Zellen sollten zu einem Zeitpunkt ultrahistologisch untersucht werden, zu dem schon RNS-Replikation stattgefunden und der Anstieg des Virustiters im Überstand gerade begonnen hatte. Die quantitativen NS-Messungen ergaben in den Infektionsmodellen einen Anstieg der viralen RNS ab 6-8 h p. i. als Signal für beginnende Genomreplikation. Der Anstieg von infektiösem Virus im Zellkulturüberstand als Merkmal für die beginnende Virusfreisetzung begann entweder zeitgleich oder kurze Zeit später (6-10 h p. i.). Es ist davon auszugehen, dass die Replikation von Pestiviren wenige Stunden nach Eintritt in die Zellen beginnt und die Genomreplikation zeitgleich mit viralen Proteinsynthese stattfindet, so dass sich der Zusammenbau neuer Virionen unmittelbar anschließen kann. Die

Zeitpunkte für EM Untersuchungen wurden in den Bereich des exponentiellen Anstiegs der Wachstumskurve gelegt. Für alle Infektionsmodelle ergaben sich auf Basis der erstellten Wachstumskinetiken sehr frühe Untersuchungszeitpunkte beginnend mit 10 h p. i. (Tab. 6, Seite 70). Die in dieser Arbeit erstellten Kinetiken decken sich mit Ergebnissen aus der Literatur; dort wurde bei der Erstellung einer Wachstumskinetik für BVDV virale RNS ab 4 h p. i. und ein Anstieg von infektiösem Virus im Überstand zwischen 10 und 14 h p. i. festgestellt (*Gong et al., 1996*).

Die drei untersuchten Infektionsmodelle BVDV-1 „NADL“, BVDV-2 „890“ und Pestivirus „Giraffe-1“ führten zu sehr ähnlichen Wachstumskurven in MDBK Zellen und zwar im Hinblick auf den Zeitraum des exponentiellen Anstiegs und die absolute Höhe des Virustiters (Abb. 10, Seite 63). In der anschließenden elektronenmikroskopischen Untersuchung zur Virusmorphogenese gab es allerdings große Unterschiede bei dem Nachweis von Virionen. Die Auswertung von BVDV-1 „NADL“ infizierten Zellen führte zu einem negativen Ergebnis, wohingegen bei BVDV-2 „890“ Infektionen selten und bei Infektionen mit „Giraffe-1“ häufiger Virionen im ER, im Golgi-Komplex, in kleinen Vesikeln und extrazellulär an der Plasmamembran gefunden wurden. Die Ursache hierfür geht aus den Wachstumskurven allein nicht hervor. Aus den Ergebnissen der quantitativen real time PCR kann abgelesen werden, dass beim Infektionsmodell „Giraffe-1“ im Vergleich zu den anderen Modellen die höchsten relativen Mengen an RNS (mehr als 100fach im Vergleich zum Zeitpunkt „0“) innerhalb der ersten 24 h p. i. erreicht werden. Die höhere RNS-Menge kann die Basis für eine ebenfalls erhöhte Translation und Virionensynthese darstellen. So lässt sich erklären, dass im Infektionsmodell „Giraffe-1“/ MDBK mehr Virionen an den Membranen des ER entstehen und aus der Zelle ausgeschleust werden als bei den anderen Modellen. Da sich dies bei Messungen des Infektiositätstiters aber offensichtlich nicht widerspiegelt, muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass ein erheblicher Teil der produzierten Virionen nicht infektiös ist.

Negative Ergebnisse ergab die ultrahistologische Untersuchung von mit BVDV-1 „cp7“ transfizierten MDBK-Zellen. In der Wachstumskurve ließ sich zwar innerhalb von 4 Stunden die gesamte initiale Freisetzung von infektiösem Virus zeigen, doch war der in diesem Modell erreichte Virustiter von 10^5 TCID₅₀/ml wahrscheinlich insgesamt zu niedrig, um elektronenmikroskopisch Virionen darstellen zu können.

In den aus der Literatur bekannten Arbeiten zur Pestivirusmorphogenese wurden u. a. pestivirusinfizierte Zellkulturen, Leukozyten und Zellen des Intestinums und der Nieren BVDV-infizierter Kälber elektronenmikroskopisch untersucht (*Bielefeldt Ohmann und Bloch,*

1982 und Bielefeldt Ohmann *et al.*, 1987). Die Autoren berichteten, dass virusähnliche Partikel in kleinen Vesikeln und größeren Vakuolen vorlagen, die in den Extrazellulärraum entleert wurden. Die Ergebnisse dieser Veröffentlichungen sind allerdings kritisch zu sehen, da die abgebildeten Vesikel wahrscheinlich MVKs darstellen und die Autoren das Auftreten der virusähnlichen Partikel auch in Vesikeln von Kontrollzellen einräumen. Spätere Studien mit BDV und BVDV in Zellkultur führten zu den ersten Aufnahmen von Pestiviruspartikeln in Lumina des rauen endoplasmatischen Reticulums (rER) (Gray und Nettleton, 1987). Die Entstehung der Virionen („Budding“) sowie die Ausschleusung aus der Zelle wurde nicht beobachtet. Diese Studien wurden zwar mit hoher m. o. i. (=1) durchgeführt, die Zellen allerdings erst 72 h p. i. fixiert.

Ein Nachweis extrazellulärer Pestivirionen an der Zellmembran gelang für KSPV und BVDV in Zellkultur sowohl morphologisch als auch durch Immunogoldmarkierung des Hüllproteins E^{ns} (Weiland, E. *et al.*, 1992; Weiland, F. *et al.*, 1999).

In diesen Studien wird erwähnt, dass VPs im ER Lumen nach BVDV-1 „NADL“ Infektion von Kulturzellen nachgewiesen wurden (Daten in der Publikation nicht gezeigt); über weitere Erkenntnisse zu „Budding“ und Virusausschleusung wurde allerdings nicht berichtet. In der genannten Studie wurden die Zellen mit einer m. o. i. von 0,1 infiziert und 46 h p. i. fixiert.

Es ist anzunehmen, dass in den bisher veröffentlichten Arbeiten zur Pestivirusmorphogenese neben einer oft niedrigen m. o. i. ein nicht optimaler Zeitpunkt nach Infektion gewählt wurde, so dass wesentliche Schritte der Virionenmorphogenese und -sekretion bereits abgelaufen waren.

5.3 Modell zur Morphogenese von Pestiviren

Obwohl die Strukturproteine von Pestiviren seit einigen Jahren bekannt sind, blieben die einzelnen Schritte bei der Synthese von Virionen sowie deren genauer Aufbau, Struktur und Stöchiometrie bisher weitgehend unbekannt. Die Replikation des viralen Genoms findet in Assoziation mit intrazellulären Membranen statt; hierfür werden sowohl die Nicht-Strukturproteine NS3 bis NS5B als auch zelluläre Faktoren benötigt. Es wird angenommen, dass sich Replikationskomplexe an alterierten Membranen bilden, ähnlich wie für Flaviviren und Hepaciviren beschrieben (Kapitel 1.7 und 1.8). Weiterhin wurde vermutet, dass sich die Strukturproteine der Virushülle an den Membranen des rER anreichern. Virionen entstehen demnach in Form von Knospung ("Budding") an intrazellulären Membranen insbesondere des rER, wobei das Kapsid mit Genom in die Hülle eingeschlossen wird. Virionen werden danach wahrscheinlich über den exozytotischen Weg aus der Zelle ausgeschleust.

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit erzielten Teilergebnisse zur Pestivirusmorphogenese losgelöst von den einzelnen Infektionsmodellen zusammengefasst und im Hinblick auf das bestehende Modell aus der Literatur diskutiert. Abb. 35 zeigt das derzeit gültige Modell (vgl. Abb. 4, Seite 21, *Murray et al., 2008a*) illustriert mit Bildern aus der vorliegenden Arbeit.

In den Untersuchungen zur Morphogenese (Kapitel 4.2) konnten bereits 10-12 h p. i. Pestivirionen intrazellulär vor allem im ER Lumen gezeigt werden. Meist wurde nur ein Virion pro ER-Lumenanschnitt gefunden, und bis auf eine geringgradige Dilatation zeigte sich keine morphologische Veränderung von betroffenen ER-Abschnitten. Auch zu späteren Untersuchungszeitpunkten (14-16 h p. i.) konnten Virionen noch im ER nachgewiesen werden. Der Moment der Virusentstehung konnte ultrahistologisch nicht eindeutig dargestellt werden; Bilder wie in Abb. 24, Seite 98, die auf die mögliche Abschnürung von VPs in das ER Lumen hinein hinweisen, können den Vorgang aufgrund der zweidimensionalen Darstellung und begrenzter Auflösung nicht eindeutig abbilden.

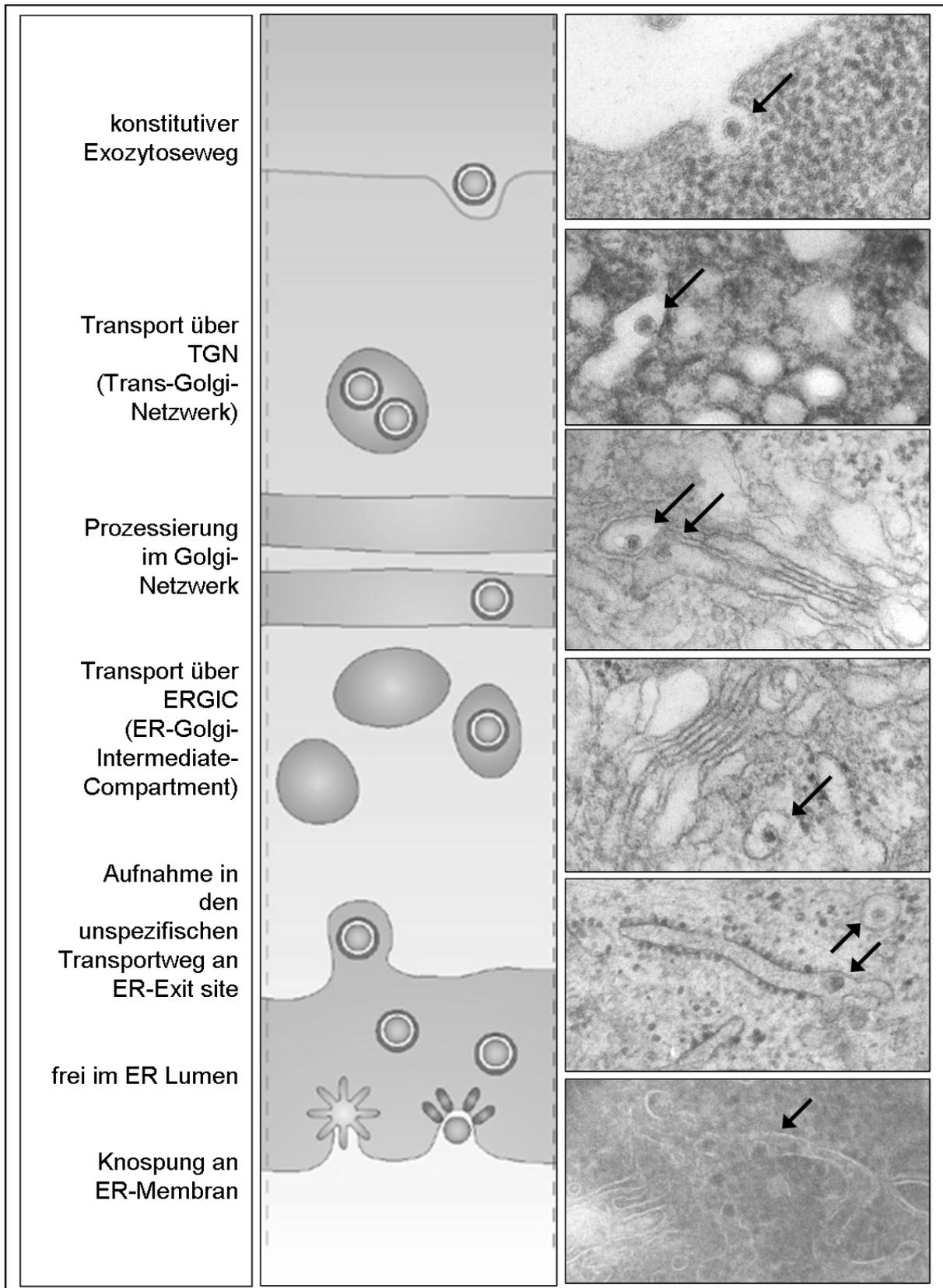


Abb. 35: Derzeit gültiges Modell zur Pestivirusmorphogenese, illustriert mit Bildern aus der vorliegenden Arbeit.

Alle Fotos entstammen dieser Arbeit (Bild Nrn. (v. oben n. unten): 401, 1546, 407, 402, 278, 1443), Zeichnung (Mitte) Ausschnitt aus Abb. 4, Seite 21 (Quelle: *Murray et al., 2008a*; mit freundlicher Genehmigung der Nature Publishing Group (NPG)).

Weiteren Aufschluss über die Morphogenese von Pestiviren können elektronentomografische Auswertungen von Dünnschnitten liefern, die einen Einblick in die dritte Dimension erlauben (siehe Flaviren: *Welsch et al., 2009*). Insgesamt wurden Bilder, die auf „Budding“ hinwiesen, nur äußerst selten gefunden, obwohl das Vorliegen von VPs im ER Lumen die am häufigsten detektierte Lokalisation von VPs in infizierten Zellen war. Daher wird postuliert, dass es sich beim „Budding“ um einen Vorgang handelt, der vergleichsweise schnell abläuft. Die Ergebnisse der immunultrahistologischen Versuche (Kapitel 4.3.2.2) untermauern das Modell der Virionenenstehung am ER, da sich das Hüllprotein E2 an Membranen des ER anreicherte und auch das Kapsidprotein in Assoziation mit dem ER nachgewiesen werden konnte. Diese Befunde konnten durch den Nachweis der Koloalokalisation mit dem ER Marker PDI abgesichert werden.

Darüber hinaus gelangen in dieser Arbeit erstmalig Aufnahmen von intrazellulären Pestivirionen außerhalb des ER Kompartimentes. So wurden Virionen im Golgi-Komplex und einzeln in kleinen Vesikeln im Zytoplasma gefunden. Einige dieser Vesikel befanden sich in unmittelbarer Nähe zur Plasmamembran, und selten wurden zum Extrazellulärraum (EZR) geöffnete Vesikel beobachtet, die VPs enthielten. Mit zunehmender Zeit nach der Infektion reicherten sich VPs im EZR an der Zelloberfläche an, wobei VPs sowohl an der apikalen, lateralen als auch an der basalen Seite von Zellen entdeckt wurden. Es bleibt anzumerken, dass es sich bei allen verwendeten Zellkulturmodellen um nicht-polarisierte Zellen handelte.

Die gewonnenen Erkenntnisse verbessern das Verständnis der Virusentstehung und ihres Transports über den sekretorischen Weg innerhalb der Zelle und führen zu folgendem Modell (siehe Abb. 35): Nach der Entstehung der Viruspartikel im ER über „Budding“ werden die VPs an ER Exit Sites in „COP II coated“ Vesikel aufgenommen und in das ERGIC (ER-Golgi-Intermediate-Compartment) abgegeben. Zu allen untersuchten Zeitpunkten p. i. waren stets mehr VPs im ER Kompartiment als in Vesikeln oder im Golgi-Komplex nachweisbar. Daraus kann geschlossen werden, dass die Ausschleusung aus dem ER Lumen entweder sehr schnell passiert oder mit einer schlechten Effizienz über den „unspezifischen Transportweg“ ohne ein spezifisches Transportsignal stattfindet.

Weiterhin kann anhand der durchgeführten Markierungsversuche von E2 im Tet-on System (siehe Kapitel 4.3.2.1.1, Seite 91) belegt werden, dass E2 nach induzierter Expression im ER lokalisiert ist und nur in Verbindung mit dem HA-„tag“ (Influenza Hämagglutinin) zur Plasmamembran transportiert und dort nachgewiesen werden kann. Somit wird das ER als Ort für den Zusammenbau von Virionen bestätigt.

Das Vorkommen von Viruspartikeln in Vesikeln des ERGIC konnte nicht eindeutig gezeigt werden, da die Identifizierung dieser Vesikel nur über den Nachweis bestimmter Markerproteine (z. B. p23, ERGIC53, KDEL-Rezeptor) möglich ist. Geeignete Antikörper standen im Rahmen dieser Arbeit nicht zur Verfügung. Virionenenthaltende Vesikel lagen allerdings meist in enger Assoziation zu ER oder Golgi-Membrankomplexen vor; da Virionen in Kompartimenten des Golgi-Apparates gefunden wurden, wird eine Beteiligung des ERGIC (einziger Transportweg vom ER zum Golgi-Komplex) für den Virionentransport postuliert. Hinweise, dass Pestiviren den Golgi-Komplex passieren, gaben bereits die Arbeiten von *Unger, 1993* und *Jordan et al., 2002a* (Endoglykosidase H Resistenz von sezernierten Virionen) sowie *Macovei et al., 2006* (Zusammenbruch der Virussekretion nach Brefeldin A Behandlung). Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Bilder von Virionen im Golgi-Komplex liefern den Beweis für dieses Postulat.

Nach der Prozessierung im Golgi-Komplex ergeben sich auf dem weiteren sekretorischen Weg der Zelle mehrere Möglichkeiten:

1. Proteine mit einer Mannose 6-Phosphat Signalmarkierung werden in „Clathrin coated“ Vesikeln zu den Lysosomen transportiert,
2. Proteine mit einem Signal für sekretorische Vesikel werden in diesen gesammelt und über den regulierten Sekretionsweg ausgeschleust (nur in sekretorischen Zellen) und
3. Proteine ohne besondere Markierung werden in unpolarisierten Zellen automatisch über den konstitutiven Weg in Vesikeln aufgenommen und über Exozytose freigesetzt.

Der letztgenannte Weg stellt die wahrscheinlichste Möglichkeit des intrazellulären Transports von Pestivirionen dar. Er wird auch „default pathway“ (frei übersetzt: „Standardweg“ oder auch „Notausgang“) genannt, da Proteine keine spezifischen Signale besitzen müssen, um früher oder später über das Trans-Golgi-Netzwerk zur Plasmamembran transportiert und dort freigesetzt zu werden. Für die eindeutige Identifizierung dieser Vesikel gilt wie für das ERGIC die Notwendigkeit des Nachweises über entsprechende Markerproteine. Die Vesikel, die Virionen beinhalteten und sich in unmittelbarer Nähe zur Plasmamembran oder sogar geöffnet zum EZR befanden, werden als Exozytose-Vesikel angesprochen, da sie sich morphologisch von Endozytose-Vesikeln („Clathrin Coated Pits“) unterscheiden lassen, über

die der Viruseintritt in die Zelle vermittelt wird (*Krey et al., 2005; Lecot et al., 2005*). Ein wichtiger Aspekt der Beobachtungen zur Virusfreisetzung in dieser Arbeit ist, dass Pestivirionen stets einzeln in kleinen Vesikeln gefunden wurden. Somit wird an dieser Stelle die Hypothese über die Freisetzung von Pestivirionen aus Vesikeln in großen Aggregaten (*Bielefeldt Ohmann und Bloch, 1982; 1987*) für die hier gewählten Zellkulturmodelle in Frage gestellt.

Der Moment der Virusfreisetzung konnte nur selten abgebildet werden. Dies beruht wahrscheinlich auf der Tatsache, dass die Exozytosevesikel nach ihrer Öffnung zum Extrazellulärraum sofort Teil der Plasmamembran werden. Die Bildung einer solchen Pore ist unter energetischen Aspekten für die Zelle sehr ungünstig, so dass die entstehende Einstülpung der Membran sofort verschwindet.

5.4 Morphologie von Pestiviren

Extrazelluläre VPs ließen sich grundsätzlich morphologisch besser darstellen als intrazelluläre Partikel. Häufig lag in Bildern der klassischen Epoxidharzeinbettung bei den Partikeln die Virushülle eher lose als in einer engen Verbindung zum dunkel kontrastierten Kapsid vor und eine hexagonale Symmetrie, wie in einem Bild der Arbeit von *Weiland, F. et al., 1999* gezeigt, konnte bei einigen Partikeln erkannt werden. Ein signifikanter Unterschied in der Virionenmorphologie, der auf Reifungsprozesse während der Ausschleusung aus der Zelle hinweisen könnte, wurde in den verschiedenen Zellkompartimenten und im Extrazellulärraum nicht beobachtet. Diese Aussage bezieht sich darauf, dass Änderungen der Kapsid- oder Hülmorphologie in den verschiedenen Kompartimenten nicht verzeichnet wurden. Untersuchungen von *Macovei et al., 2006* zeigten, dass nach Blockade des sekretorischen Weges durch Brefeldin A auf Höhe des cis-Golgi-Kompartiments aus der Zelle gewonnene Virionen infektiös waren. Daher ist davon auszugehen, dass Pestivirionen bereits beim Verlassen des ER-Kompartiments infektiös sind und kein entscheidender Reifungsprozess im Golgi-Komplex, wie für das M-Protein von Flaviviren gezeigt, notwendig ist (siehe Abb. 4). Ein Merkmal sämtlicher abgebildeter Virionen war, dass sich stets nur eine einfache Membran der Virionenhülle darstellen ließ, die entweder lose oder eng anliegend zur inneren Membran und zum dunkel kontrastierten Kapsid lokalisiert war. Dies lässt auf eine sehr enge Verbindung zwischen Kapsid und innerer Hülmembran schließen und deckt sich mit Darstellungen aus der Literatur sowie mit den Untersuchungen von *Unger, 1993*, in denen es nicht gelang, durch chemische Behandlung die gesamte Hülle zu entfernen und Viruskapside isoliert darzustellen.

5.5 Replikationsort von Pestiviren

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf dem Aspekt der Morphogenese von Pestivirionen. Bei den ultrahistologischen Auswertungen wurde außerdem nach Alterationen von zellulären Membranen aufgrund von Virusreplikation gesucht. Für die untersuchten Infektionsmodelle konnten zu keinem der untersuchten Zeitpunkte nach der Infektion bzw. Transfektion signifikante Membranveränderungen gefunden werden, die auf die Neu-Entstehung eines Kompartiments für Virusreplikation hinweisen. Es bleibt anzumerken, dass die Replikation von Pestiviren bereits einige Stunden vor den gewählten Untersuchungszeitpunkten von 10-16 h p. i. beginnt (6 h p. i. eigene Arbeiten, 4 h p. i. *Gong et al., 1996; 1998*), und dass die Studien, die Membranveränderungen als Folge der Replikation von Vertretern des Genus *Flavivirus* zeigen, frühestens 24 h p. i. (*Mackenzie et al., 1996a; Westaway et al., 1997a; 1997b; 1999; 2001; Welsch et al., 2009*) durchgeführt wurden. Um die Existenz umfassender Membranalterationen als Folge der Pestivirusreplikation auszuschließen, ist eine Ausweitung der ultrahistologischen Untersuchung auf frühere (< 10 h p. i.) und spätere (> 24 h p. i., bei nzp Viren) Zeitpunkte erforderlich. Die immunelektronenmikroskopischen Untersuchungen erbrachten im Hinblick auf die bei der Genomreplikation beteiligten viralen Nicht-Strukturproteine wenig Erkenntnisse. Mit keinem der im Institut zur Verfügung stehenden Antikörper konnten pestivirale Nicht-Strukturproteine über Immunogoldmarkierung nachgewiesen werden.

Welsch et al., 2009 fanden bei ultrahistologischen Untersuchungen von mit Dengue Virus infizierten Zellen Vesikel (\emptyset ca. 80-90 nm) innerhalb von ER Lumina, die als Ort der Replikation vermutet werden, sowie Poren in diesen Vesikeln, durch die synthetisierte RNS nach Replikation ausgeschleust werden könnte. Solche Vesikel innerhalb von ER Lumina wurden zu keinem Zeitpunkt nach der Infektion mit Pestiviren in den verwendeten Modellen beobachtet.

Bemerkenswerterweise gelang mithilfe der Immunelektronenmikroskopie der Nachweis von Doppelstrang-RNS. Doppelstrang-RNS entsteht während der Vermehrung von RNS-Viren und kann daher als Marker für die virale Genomreplikation diskutiert werden. Interessanterweise trat eine intensive Markierung im Zytoplasma, sowie am häufigsten in zellulären Kompartimenten auf, die als multivesikuläre Körperchen (MVK) oder multilamelläre Körperchen (MLK) identifiziert wurden und somit dem endosomalen Kompartiment angehören. Im folgenden Kapitel wird auf eine mögliche Rolle des endosomalen Kompartiments bei der Vermehrung von Pestiviren näher eingegangen.

5.6 Die Rolle des endosomalen Kompartiments bei der Vermehrung von Pestiviren

Die ultrahistologischen und immunultrahistologischen Untersuchungen in dieser Arbeit lieferten mehrfach Hinweise auf eine Rolle des endosomalen Kompartiments bei der Vermehrung von Pestiviren u. a. durch Befunde in MVKs. MVKs entstehen auf dem Weg von frühen zu späten Endosomen und tragen ihren Namen, da sie große Mengen an invaginierten Membranen und Vesikeln, die später in Lysosomen zersetzt werden, beinhalten. Das endosomale Kompartiment schließt weiterhin endozytotische Vesikel ein, durch die Komponenten der Plasmamembran oder extrazelluläres Material internalisiert werden und in Endosomen transportiert werden. Dort kann der Inhalt der Vesikel entweder recycelt oder den Lysosomen zum Abbau zugeführt werden. Abb. 36 verdeutlicht die enge Verknüpfung des endosomalen Kompartiments mit anderen intrazellulären Transportwegen.

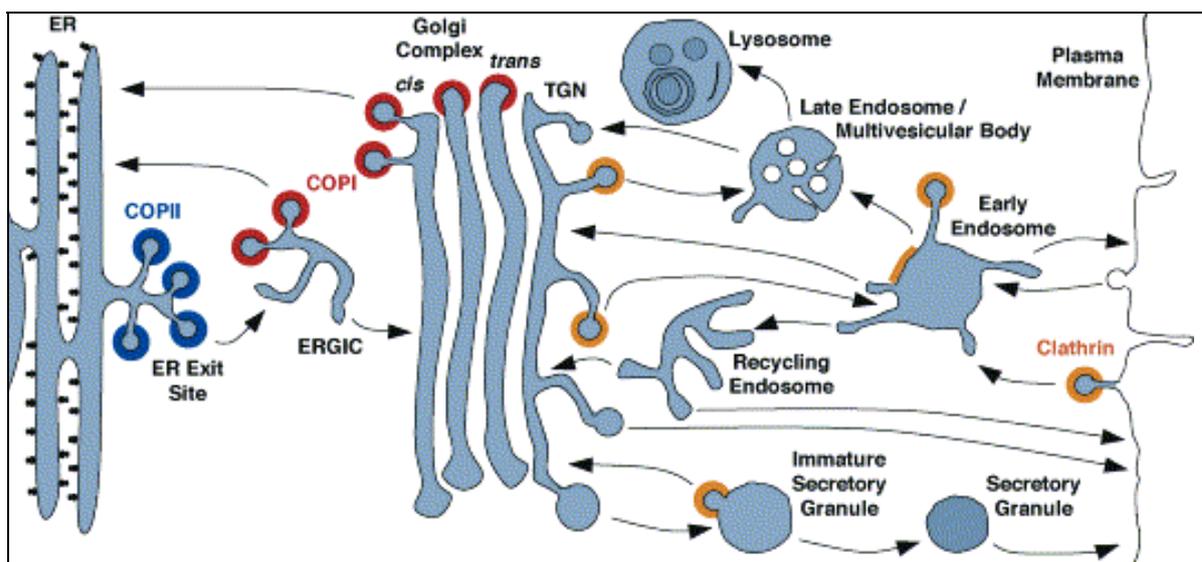


Abb. 36: Einbindung des endosomalen Kompartiments in intrazelluläre Transportwege.

Das endosomale Kompartiment ist über frühe Endosomen, späte Endosomen und Recycling Endosomen mit dem Golgi-Komplex und somit dem sekretorischen Weg verbunden. Frühe Endosomen und Recycling Endosomen stehen weiterhin in direktem Kontakt mit der Plasmamembran. Late Endosome/ Multivesicular Body = MVK (aus *Bonifacino und Glick, 2004*, mit Genehmigung von Elsevier Limited, Oxford, UK).

Eine Beteiligung des endosomalen Kompartiments bei der Virionentstehung wurde bereits für andere RNS-Viren postuliert:

Virionen des Marburg Virus aus der Familie der *Filoviridae* entstehen durch Abschnürung an der Plasmamembran infizierter Zellen, insbesondere an den Zellfortsätzen (Filopodien). Das Virus nutzt den sogenannten „retrograden“ endosomalen Transportweg, um synthetisiertes Matrixprotein und teilweise auch Hüllprotein über MVK ähnliche Vesikel zur

Plasmamembran zu transportieren und diese Virusproteine dort für die Virionenentstehung bereit zu stellen. Diese Erkenntnisse wurden aufgrund von ultrahistologischen Studien zur Kollokalisierung der Virusproteine mit Markerproteinen des endosomalen Kompartiments gewonnen (*Kolesnikova et al., 2004b; Mittler et al., 2007*).

Für Retroviren wird eine Beteiligung des endosomalen Kompartiments bei der Entstehung von Virionen ebenfalls diskutiert. Retroviren schnüren sich direkt an der Plasmamembran in den Extrazellulärraum ab. Hierbei machen sie sich den sogenannten „ESCRT pathway“ („endosomal sorting complex required for transport“) zunutze, dessen reguläre Aufgabe darin besteht, zur Degradation bestimmte (und mit Ubiquitin markierte) Zelloberflächenrezeptoren in intraluminale Vesikel (ILV) von MVKs einzubauen. Das HIV (Humanes Immundefizienz Virus) macht sich diese zelluläre Maschinerie, die eine zytoplasma-abgewandte Abschnürung von Vesikeln ermöglicht, zunutze, indem das virale Gag-Protein an freie ESCRT-Proteine bindet und so an der Plasmamembran eine Virionenabschnürung in den Extrazellulärraum erreicht (*Welsch et al., 2007*). Es wurde weiterhin gezeigt, dass Retroviren in Vesikeln des späten endosomalen Kompartiments vorkommen und dass freigesetzte Virionen MVK-Markerproteine tragen (*Morita und Sundquist, 2004*). Der genaue Mechanismus, wie die Virionen dabei einer Degradation in den Lysosomen entgehen und stattdessen an der Plasmamembran freigesetzt werden, ist noch nicht geklärt. Außerdem wird diese Theorie in der aktuellen Literatur kontrovers diskutiert (*Orenstein, 2007*), da es sich bei zuvor in ultrahistologischen Studien als MVKs identifizierten Vesikeln lediglich um Einstülpungen der Plasmamembran und somit um extrazelluläre Bereiche handeln könnte (*Pelchen-Matthews et al., 2004*).

Im Verlauf der in dieser Arbeit durchgeführten ultrahistologischen Untersuchungen fielen sowohl bei den Studien zur Morphogenese als auch in den Markierungsversuchen zur Proteindistribution immer wieder positive Befunde in MVKs oder MLKs des endosomalen Kompartimentes auf. Zuerst wurden mögliche VPs mit hexagonaler Form in MVKs von mit „Giraffe-1“ infizierten Zellen gefunden. Eine eindeutige Identifikation war allerdings allein auf Basis der Morphologie-Kriterien nicht möglich, da auch in MVKs nicht-infizierter Zellen häufig sehr ähnliche Partikel in Größe und Struktur (die oben erwähnten ILVs) vorkommen.

Weiterhin gelang der Nachweis des Kapsidproteins durch Immunmarkierungen an Gefrierdünnenschnitten (v. a. „Giraffe-1“, 13 h p. i.) in MVKs, und der einzige Nachweis des E^{ms} Proteins war mit einer Lokalisierung in MLKs und MVKs verbunden (BVDV-2 „890“, 24 h p. i.). Das E2 Protein wurde ebenfalls in MVKs nachgewiesen, allerdings nur in dem Modell mit der höchsten Markierungsintensität für das Protein („Alfort-Tüb-JIV“).

Besonders deutlich fiel der Nachweis von dsRNS in MVKs aus („Giraffe-1“, 13 h p. i. und BVDV-2 „890“, 13 h und 24 h p. i.). Die Markierungen zeichneten sich durch starke punktuelle Anhäufung von Goldpartikeln meist in Assoziation mit MVK-ähnlichen Vesikeln (an der Vesikelmembran oder innerhalb der Vesikel) aus.

Der Nachweis von dsRNS könnte die Lokalisation von Replikationskomplexen in diesem Kompartiment anzeigen. Die dsRNS müsste allerdings vor dem endosomalen Milieu geschützt werden (z. B. durch eine Vesikel-Membran). Solche Vesikel mit Verbindung zur MVK-Membran konnten zwar durchaus gezeigt werden (siehe Abb. 18, Seite 81), aber nicht in Zusammenhang mit der Markierung von dsRNS. Eine alternative Erklärung ist, dass dsRNS über die MVKs der Degradation in Lysosomen zugeführt wird. Es bleibt noch zu klären, über welchen Transportweg die dsRNS in dieses Kompartiment gerät. Weiter ist möglich, dass es sich bei den Vesikeln, in denen dsRNS nachgewiesen wurde, nicht um MVKs, sondern um Autophagosomen handelt. Diese bilden sich ausgehend von kleinen Vesikeln im Zytoplasma als Membranhüllen, die Proteine oder auch ganze Zellorganellen umschließen und dann über Verschmelzung den Lysosomen zuführen können. Die Bildung von Autophagosomen ist streng reguliert und sehr komplex; auslösende Faktoren können Energiebedarf, Zelldifferenzierung oder auch Infektionen mit Bakterien oder Viren sein (Alberts *et al.*, 2008). DsRNS im Zytoplasma als Folge von Virusinfektionen (Herpesviren) ist als ein Auslöser von Autophagie über die Aktivierung der PKR (Protein Kinase R) bekannt (Kirkegaard *et al.*, 2004).

In diesem Zusammenhang ist der Nachweis des E^{rns} ausschließlich innerhalb von MLKs und MVKs 24 h p. i. bemerkenswert. Iqbal *et al.* zeigten bereits, dass E^{rns} dsRNS binden kann und bei niedrigem pH-Wert seine RNase Aktivität entwickelt (Iqbal *et al.*, 2004). Weiterhin wurde nachgewiesen, dass E^{rns} eine Fähigkeit zur Translokation an Membranen besitzt und auf diese Weise nach seiner Sezernierung in den Überstand wieder in die Zelle gelangen könnte (Langedijk, 2002) um so dsRNS zu binden und womöglich in das endosomale Kompartiment zu überführen. Dort könnte es durch die RNase Aktivität zu Abbau von dsRNS kommen und so zu einer Unterdrückung der angeborenen Immunantwort (Bildung von alpha- und beta-Interferon) der Wirtszelle. Ein Beleg hierfür konnte in den untersuchten Modellen nicht erbracht werden, da eine Koloalisationsstudie von E^{rns} und dsRNS aufgrund fehlender Antikörperkombination für eine Doppelmarkierung nicht durchgeführt werden konnte. Weiterhin wurden die erfolgreichen Nachweise für E^{rns} und dsRNS jeweils an unterschiedlichen Infektionsmodellen und an unterschiedlichen endosomalen Strukturen (MLKs und MVKs) geführt.

In MVKs gelang der Nachweis des Kapsidproteins und des E2 Proteins. Im Hinblick auf die morphologischen Befunde zum Vorliegen von virusähnlichen Partikeln in MVKs handelt es sich um einen bemerkenswerten Nachweis. Diese Befunde führen zu der Hypothese, dass tatsächlich Pestivirionen in MVKs infizierter Zellen vorliegen. Das endosomale Kompartiment ist eng mit dem sekretorischen Weg verbunden; aus dieser Verbindung ergeben sich mehrere Erklärungsmöglichkeiten für das Vorkommen von Virionen in MVKs:

- Sezernierte Virionen werden durch „Clathrin coated pits“ endozytotisch aufgenommen und in die frühen Endosomen transferiert. Dort kommt es bei Absenkung des pH Werts zu einer Fusion der Vesikelmembranen und Freisetzung des Genoms in das Zytoplasma (*Krey et al., 2005*). In diesem Fall würde es sich bei dem Fund von Pestivirionen in MVKs um einen Moment während der Infektion der Zelle handeln. Da die Zellen frühestens 12 h p. i. für die Untersuchung fixiert wurden, ist das Vorliegen einer Erstinfektion zu diesem Untersuchungszeitpunkt allerdings unwahrscheinlich. Eine Reinfektion einer bereits infizierten Zelle ist ebenso unwahrscheinlich, da *Lee et al., 2005* zeigten, dass Kulturzellen nach Infektion mit Pestiviren bereits auf der Stufe des Viruseintritts für Infektionen mit weiteren Pestiviren nicht mehr empfänglich sind.
- Auf dem sekretorischen Weg der Zelle sind in der Literatur bisher drei verschiedene Möglichkeiten des Proteinsorting im *trans*-Golgi-Bereich beschrieben (siehe auch Abb. 6, Seite 23). Für neu synthetisierte lysosomale Enzyme (Hydrolasen) gibt es einen Abzweig vom sekretorischen Weg zum endosomalen Kompartiment. Diese Proteine tragen an Aminogruppen gekoppelte Oligosaccharide, die von im Golgi-Komplex lokalisierten Enzymen erkannt werden, die eine Mannose-6-Phosphatmarkierung durchführen. Im *trans*-Golgi-Apparat werden die M6P-Reste von membranintegralen M6P-Rezeptoren erkannt. Im späten Endosom trennen sich die M6P-Rezeptoren bei pH6 wieder von ihren Liganden und werden recycelt (*Alberts et al., 2008*). Dieser signalinduzierte Transport in das endosomale Kompartiment ist speziell auf lysosomale Enzyme zugeschnitten; momentan gibt es keine Anhaltspunkte dafür, dass pestivirale Proteine entsprechende Signalsequenzen enthalten und so Virionen auf diesem Weg in MVKs transportiert werden könnten.
- Wie bereits angesprochen, besitzen Zellen die Fähigkeit zur Autophagie. Sie dient vor allem dem Recycling von Zellorganellen. Autophagie findet kontinuierlich statt, kann aber auch aufgrund von Reizen (z. B. Virusinfektion) ausgelöst werden (*Cuervo, 2004; Kirkegaard et al., 2004*). Es kann zur unselektierten Invagination von zellulärem Material in große Vesikel kommen, die MVKs morphologisch durchaus ähnlich sehen können.

Daher besteht die Möglichkeit, dass sich die nachgewiesenen Virionen ebenso wie die nachgewiesene dsRNS in Autophagosomen befinden, deren Bildung durch die Infektion der Zelle provoziert wird. Diese Vesikel fusionieren immer mit Lysosomen, und der Inhalt wird enzymatisch abgebaut und recycelt. Ein morphologisches Merkmal von Autophagosomen sind doppelschichtige Hüllmembranen, die bei der Bildung der Phagosomen entstehen. Dieses Merkmal wurde allerdings nicht immer im Zusammenhang mit virusähnlichen Partikeln in MVKs gefunden.

- Der Weg in das endosomale Kompartiment bedeutet nicht immer Degradation des gesamten Inhalts in späten Endosomen und Lysosomen, denn es gibt einerseits „Recycling“-Endosomen“, die membrangebundene Endozytose-Rezeptoren zurück an die Plasmamembran transportieren und andererseits die „lysosomale Sekretion“, die es Zellen erlaubt, „unverdauliches“ Material abzugeben. Dieser Weg wird insbesondere in Stresssituationen genutzt, so dass sich die Frage stellt, ob Pestivirionen zufällig oder gezielt in das endosomale Kompartiment gelangen. Weiterhin ist noch unklar, ob sie im Anschluss auf diesem Weg aus der Zelle als nicht infektiöse Virionen „entsorgt“ werden oder ob sie den retrograden endosomalen Transportweg gezielt für ihre Freisetzung nutzen können.

Aus der Liste der aufgeführten Möglichkeiten zur Interpretation der Befunde im endosomalen Kompartiment erscheinen die Hypothesen zur Autophagie und zur lysosomalen Sekretion am wahrscheinlichsten. Beide Mechanismen stellen Reaktionen der Zelle auf Stress dar, und eine Stresssituation liegt nach Infektion mit Pestiviren und ihrer Replikation im Zytoplasma für die Zelle eindeutig vor. Anhand dieser Modelle lassen sich sowohl der Nachweis von dsRNS als auch von Pestivirusproteinen und Virionen innerhalb der Vesikel-Strukturen erklären. In der Literatur findet das verstärkte Auftreten von zytoplasmatischen Vakuolen nach Infektion von MDBK Zellen mit zp BVDV-Isolaten gegenwärtig Beachtung. *Birk et al., 2008* postulierten einen „neuartigen“ Weg des Zelltods nach zp Pestivirusinfektion, der vor allem durch Vakuolisierung gekennzeichnet ist und sich von klassischer Autophagie und Apoptose unterscheiden soll. *Weiskircher et al., 2009* berichten vom Nachweis des NS4B Proteins in Assoziation mit alterierten zellulären Membranen, die sich bei genauerer Betrachtung als Vakuolen mit Ähnlichkeit zu MVKs und MLKs herausstellen könnten.

Zurzeit gibt es keine weiteren publizierten Arbeiten, die Erkenntnisse zur Rolle des endosomalen Kompartiments bei der Pestivirusvermehrung vermitteln. Es wird daher als wichtig angesehen, weitere Aufschlüsse über den Ursprung und die Identifizierung der entsprechenden Vakuolen bzw. MVKs zu gewinnen. Ein bedeutender Aspekt hierbei ist die

Durchführung von Kolokalisationsexperimenten mit Pestivirusproteinen und Markerproteinen des endosomalen Kompartiments. Neben dem Nachweis einer Kolokalisation könnten diese Experimente zur Klassifizierung der Vesikel (z. B. als frühe oder späte Endosomen) führen.

Abschließend soll hervorgehoben werden, dass in dieser Arbeit erstmals Pestivirusproteine ultrahistologisch an infizierten Zellen nachgewiesen werden konnten. Durch die Einführung der Immunogoldmarkierung an Gefrierschnitten nach TOKUYASU wurde eine neue Dimension eröffnet, die ein besseres Verständnis der Pestivirusreplikation und Morphogenese ermöglicht. Um weitere Erkenntnisse durch die etablierte Methodik zu gewinnen, ist es notwendig, möglichst viele unterschiedliche Antikörper gegen pestivirale Struktur- und Nicht-Strukturproteine einzusetzen und auf ihre Eignung für die Immunultrahistologie zu testen. In Verbindung mit einer umfassenden Auswahl an Antikörpern gegen zelluläre Markerproteine könnten mithilfe dieser Methode die Vorgänge der Pestivirusvermehrung ultrahistologisch umfassender aufgeklärt werden. Eine weitere wichtige Rolle kommt in Zukunft der dreidimensionalen Darstellung von ultrahistologischen Bildern durch die Elektronentomografie zu, die eine Aufklärung der Ereignisse zur Pestivirusvermehrung auf subzellulärer Ebene erlauben kann.

6 Zusammenfassung

Das Genus *Pestivirus* umfasst mit dem Virus der Klassischen Schweinepest (KSPV), dem Virus der Bovinen Virus Diarrhoe (BVDV-1 und -2) und dem Border Disease Virus (BDV) veterinärmedizinisch bedeutsame Virusspezies. Pestiviren werden aufgrund ihrer Morphologie, Genomorganisation und Strategie der Genexpression zur Virusfamilie *Flaviviridae* gezählt. Zu dieser Familie gehören außerdem die Genera *Flavivirus* und *Hepacivirus*. Obwohl die Strukturproteine von Pestiviren seit einigen Jahren bekannt sind, blieben die einzelnen Schritte bei der Entstehung neuer Virionen sowie deren genauer Aufbau, Struktur und Stöchiometrie bisher weitgehend unbekannt. Es wird vermutet, dass sich die Strukturproteine der Virushülle an den Membranen des rauen endoplasmatischen Retikulums (rER) anreichern. Virionen entstehen demnach durch Knospung ("Budding") an intrazellulären Membranen, wobei Kapside mit Genom in die Hülle eingeschlossen und Virionen anschließend über den sekretorischen Weg ausgeschleust werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Morphologie und Morphogenese von Pestiviren durch Einsatz ultrahistologischer Verfahren aufzuklären.

Im ersten Teil der Arbeit wurden mithilfe von Wachstumskurven und Nukleinsäure-Quantifizierung Infektionsmodelle erarbeitet, die anschließend im zweiten Teil der Arbeit ultrahistologische Studien an pestivirusinfizierten Zellen ermöglichten. Es stellte sich heraus, dass insbesondere das Pestivirus „Giraffe-1“ durch eine vergleichsweise hohe intrazelluläre Virionenkonzentration für ultrahistologische Studien geeignet ist. Die EM-Untersuchungen konnten den vermuteten Weg für die Virusmorphogenese und -ausschleusung aus der Zelle durch den Nachweis von Virionen im ER, Golgi-Komplex, Transportvesikeln und bei der Exozytose belegen. Der Moment des „Budding“ konnte allerdings nicht gezeigt werden. Intrazelluläre Membranalterationen, bei Vertretern der Genera *Flavivirus* und *Hepacivirus* beschrieben als Folge der Bildung viraler Replikationskomplexe, wurden für die verwendeten Infektionsmodelle in Kulturzellen nicht beobachtet.

Im dritten Teil der Arbeit sollten schließlich antigenerhaltende Verfahren zum Nachweis von Pestivirusproteinen in infizierten Zellen eingesetzt werden. Es wurden Protokolle zu Methacrylat-Kunststoffeinbettungen sowie Gefriereinbettungen nach TOKUYASU eingeführt. Zur Etablierung der Verfahren wurden u. a. Expressionssysteme gewählt, die eine Überexpression viraler Proteine erlaubten.

Basierend auf den Auswertungen der Markierungsversuche an diesen Expressionsmodellen wurde schließlich die Methode nach TOKUYASU zur Untersuchung pestivirusinfizierter

Zellen ausgewählt. Am Institut stand eine Reihe von Antikörpern zum Nachweis von Pestivirusproteinen zur Verfügung, mit denen der Nachweis des Kapsidproteins, der Hüllproteine E^{ms}, E1 und E2 sowie von dsRNS als Marker für virale Replikationskomplexe gelang. Für das Kapsidprotein und E2 konnte durch Kolokalisationsexperimente mit dem ER Marker PDI eine Lokalisierung im endoplasmatischen Retikulum nachgewiesen werden. Interessant ist, dass das Kapsidprotein, E^{ms}, E2 und dsRNS in Vesikeln/ Vakuolen des endosomalen Kompartiments vorliegen. Es bleibt zu klären, wie Pestiviren in dieses Kompartiment geraten bzw. eindringen. Weiterhin ist noch unklar, ob für sie dadurch Vorteile für die Virionenfreesetzung entstehen oder ob es sich vielmehr um eine „Entsorgungsmaßnahme“ der infizierten Zellen handelt, bei der Virionen degradiert werden.

Mit der Methode nach TOKUYASU wurde eine attraktive Möglichkeit zum Virusproteinnachweis und für Kolokalisationsstudien im ultrastrukturellen Bereich infizierter Kulturzellen erfolgreich etabliert. Die in dieser Arbeit eingesetzten Methoden zur ultrastrukturellen Analyse von pestivirusinfizierten Zellen legen aufgrund der erzielten Ergebnisse den Grundstein für weiterführende Kolokalisationsexperimente.

Weiterhin sollte auf der Grundlage der erzielten Ergebnisse zur Darstellung von Pestivirionen der Einsatz der Elektronentomografie in Betracht gezogen werden, um eine dreidimensionale und somit verbesserte Auflösung zellulärer/ viraler Strukturen zur besseren Analyse von Morphogenese Prozessen zu erreichen.

7 Summary

The genus *Pestivirus* comprises with Classical Swine Fever Virus (CSFV), Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV-1 and -2) and Border Disease Virus (BDV) virus species of great importance in veterinary medicine. Pestiviruses are assigned to the virus family *Flaviviridae* due to their virion morphology, genome organisation and strategy of gene expression. Additional members of this family are the genera *Flavivirus* and *Hepacivirus*. Although pestiviral structural proteins are known for many years several aspects of virion assembly remained unknown as well as virion composition, structure and stoichiometry. It is assumed that the structural proteins of the viral envelope accumulate at membranes of the rough endoplasmic reticulum (rER). Accordingly, virions are thought to bud at intracellular ER derived membranes where the capsid containing the viral genome is surrounded by the viral envelope. Afterwards virions are supposed to be released from cells via the host cell secretory pathway.

The aim of the present work was to examine morphology and morphogenesis of pestiviruses in infected culture cells using ultrahistological methods.

In the first part of the thesis infection models were established based on virus growth curves and quantification of viral nucleic acid. In the second part these models allowed ultrahistological studies on pestivirus infected culture cells. It turned out that especially the pestivirus “Giraffe-1” is suitable for ultrastructural studies due to the relatively high intracellular virus load. The electron microscopy examinations demonstrated the supposed pathway of pestiviral morphogenesis and egress from infected cells by virion detection inside the ER, Golgi complex, transport vesicles and exocytosis vesicles. The moment of virus budding could not be clearly shown. Intracellular membrane alterations, described as side effect of viral replication complex formation in flavivirus and hepacivirus replication were not observed in culture cells for the pestivirus infection models.

In the third part of the project antigen preserving methods were applied for ultrahistological detection of pestiviral proteins in infected culture cells. Within the scope of this work protocols for methacrylate-resin embedding as well as cryo-embedding (TOKUYASU) were introduced. To establish the methods cell culture expression models were chosen which allowed over-expression of viral proteins.

The cryo-embedding method of TOKUYASU was applied for labeling experiments of pestivirus infected culture cells. At the institute a set of antibodies against different pestivirus proteins was available. In the scope of this work the detection of the capsid protein, the

envelope proteins E^{ms}, E1 and E2 as well as of dsRNS as marker for viral replication complexes was accomplished. By colocalisation experiments with the ER marker PDI a localisation in the ER could be shown for the capsid protein and E2. An interesting finding was the localisation of the capsid protein, E^{ms}, E2 and dsRNS in vesicles/ vacuoles of the endosomal compartment. It remains to be clarified whether pestiviruses enter this compartment in order to utilize distinct mechanisms for their replication or whether this detection reflects efforts of the infected cells to eliminate the virus.

With the method of TOKUYASU an attractive method for virus protein detection and colocalisation studies on the ultrastructural level has been established. The methods for ultrastructural analysis of pestivirus infected cells applied in this work represent the basis for further colocalisation experiments.

Based on the presented results of pestivirion detection the application of electron tomography should be considered. This will allow a three dimensional and therefore improved resolution of cellular and viral structures and thereby an extensive analysis of virion morphogenesis processes.

8 Literaturverzeichnis

- Agapov, E. V., Murray, C. L., Frolov, I., Qu, L., Myers, T. M. und Rice, C. M. (2004). Uncleaved NS2-3 Is Required for Production of Infectious Bovine Viral Diarrhea Virus. *J. Virol.* **78**, 2414-2425.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Walter, P. (2008). *Molecular Biology of the Cell*, Fifth Edition. New York, Garland Science.
- Ansari, I. H., Chen, L. M., Liang, D., Gil, L. H., Zhong, W. und Donis, R. O. (2004). Involvement of a bovine viral diarrhoea virus NS5B locus in virion assembly. *J Virol* **78**, 9612-23.
- Applied Biosystems (2001). Relative Quantitation of Gene Expression. *ABI Prism 7700 Sequence Detection System User Bulletin #2*.
- Avalos Ramirez, R., Orlich, M., Thiel, H.-J. und Becher, P. (2001). Evidence for the presence of two novel pestivirus species. *Virology* **286**, 456-65.
- Baker, J. C. (1987). Bovine viral diarrhoea virus: a review. *J Am Vet Med Assoc* **190**, 1449-58.
- Becher, P., Orlich, M., Kosmidou, A., König, M., Baroth, M. und Thiel, H.-J. (1999). 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. und Thiel, H.-J. (1997). Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. *J Gen Virol* **78** (Pt 6), 1357-66.
- Behrens, S. E., Grassmann, C. W., Thiel, H.-J., Meyers, G. und Tautz, N. (1998). Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon. *J Virol* **72**, 2364-72.
- Bielefeldt Ohmann, H. und Bloch, B. (1982). Electron Microscopic Studies of Bovine Viral Diarrhoea Virus in Tissues of Diseased Calves and in Cell Cultures. *Archives of Virology* **71**, 57-74.
- Bielefeldt Ohmann, H., Ronsholt, L. und Bloch, B. (1987). Demonstration of bovine viral diarrhoea virus in peripheral blood mononuclear cells of persistently infected, clinically normal cattle. *J Gen Virol* **68** (Pt 7), 1971-82.
- Birk, A. V., Dubovi, E. J., Cohen-Gould, L., Donis, R. und Szeto, H. H. (2008). Cytoplasmic vacuolization responses to cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Virus Res* **132**, 76-85.
- Blanchard, E., Brand, D., Trassard, S., Goudeau, A. und Roingeard, P. (2002). Hepatitis C virus-like particle morphogenesis. *J Virol* **76**, 4073-9.
- Bonifacio, J. S. und Glick, B. S. (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* **116**, 153-66.
- Branza-Nichita, N., Durantel, D., Carrouée-Durantel, S., Dwek, R. A. und Zitzmann, N. (2001). Antiviral Effect of N-Butyldeoxynojirimycin against Bovine Viral Diarrhoea Virus Correlates with Misfolding of E2 Envelope Proteins and Impairment of Their Association into E1-E2 Heterodimers. *J. Virol.* **75**, 3527-3536.
- Brock, K. V., Deng, R. und Riblet, S. M. (1992). Nucleotide sequencing of 5' and 3' termini of bovine viral diarrhoea virus by RNA ligation and PCR. *J Virol Methods* **38**, 39-46.
- Brownlie, J., Clarke, M. C. und Howard, C. J. (1984). Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Vet Rec* **114**, 535-6.
- Carlemalm, E., Garavito, R. M. und Villiger, W. (1982). Resin development for electron microscopy and an analysis of embedding at low temperature *J. Microsc.* **126**, 123-143.
- Casaro, A. P., Kendrick, J. W. und Kennedy, P. C. (1971). Response of the bovine fetus to bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus. *Am J Vet Res* **32**, 1543-62.
- Causton, B. E. (1984). "The choice of resins for immunocytochemistry". *Immunolabelling for electron microscopy*. J. M. Polak and I. M. Carndell. Amsterdam, Elsevier.
- Cedillo-Rosales, S. (2004). Charakterisierung ruminanter Pestiviren mittels Polymerasekettenreaktion und monoklonaler Antikörper. Dissertation. Institut für Virologie, Justus-Liebig-Universität Giessen.
- Chang, J. J., McDowall, A. W., Lepault, J., Freeman, R., Walter, C. A. und Dubochet, J. (1981). Freezing, sectioning and observation artefacts of frozen hydrated sections for electron microscopy. *J Microsc* **132**, 109-123.

- Chon, S. K., Perez, D. R. und Donis, R. O. (1998).** Genetic analysis of the internal ribosome entry segment of bovine viral diarrhoea virus. *Virology* **251**, 370-82.
- Collett, M. S., Anderson, D. K. und Retzel, E. (1988a).** Comparisons of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus with members of the flaviviridae. *J Gen Virol* **69** (Pt 10), 2637-43.
- Collett, M. S., Larson, R., Belzer, S. K. und Retzel, E. (1988b).** Proteins encoded by bovine viral diarrhoea virus: the genomic organization of a pestivirus. *Virology* **165**, 200-8.
- Collett, M. S., Wiskerchen, M., Welniak, E. und Belzer, S. K. (1991).** Bovine viral diarrhoea virus genomic organization. *Arch Virol Suppl* **3**, 19-27.
- Corapi, W. V., Donis, R. O. und Dubovi, E. J. (1988).** Monoclonal antibody analyses of cytopathic and noncytopathic viruses from fatal bovine viral diarrhoea virus infections. *J Virol* **62**, 2823-7.
- Corapi, W. V., Donis, R. O. und 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**, 1388-94.
- Corapi, W. V., Elliott, R. D., French, T. W., Arthur, D. G., Bezek, D. M. und Dubovi, E. J. (1990b).** Thrombocytopenia and hemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhoea virus. *J Am Vet Med Assoc* **196**, 590-6.
- Coria, M. F. und Mc Clurkin, A. W. (1978).** Specific immune tolerance in an apparently healthy bull persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *J Am Vet Med Assoc* **172**, 449-51.
- Cuervo, A. M. (2004).** Autophagy: many paths to the same end. *Mol Cell Biochem* **263**, 55-72.
- Di Marco, S., Volpari, C., Tomei, L., Altamura, S., Harper, S., Narjes, F., Koch, U., Rowley, M., De Francesco, R., Migliaccio, G. und Carfi, A. (2005).** Interdomain communication in hepatitis C virus polymerase abolished by small molecule inhibitors bound to a novel allosteric site. *J Biol Chem* **280**, 29765-70.
- Durantel, D., Carrouée-Durantel, S., Branza-Nichita, N., Dwek, R. A. und Zitzmann, N. (2004).** Effects of Interferon, Ribavirin, and Iminosugar Derivates on Cells Persistently Infected with Noncytopathic Bovine Viral Diarrhoea Virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 497-504.
- Egger, D., Wölk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H. E., Moradpour, D. und Bienz, K. (2002).** Expression of Hepatitis C Virus Proteins Induces Distinct Membrane Alterations Including a Candidate Viral Replication Complex. *J. Virol.* **76**, 5974-5984.
- Elbers, K., Tautz, N., Becher, P., Stoll, D., Rügenapf, T. und Thiel, H.-J. (1996).** Processing in the pestivirus E2-NS2 region: identification of proteins p7 and E2p7. *J Virol* **70**, 4131-5.
- Fetzer, C., Tews, B. A. und Meyers, G. (2005).** The carboxy-terminal sequence of the pestivirus glycoprotein E(rns) represents an unusual type of membrane anchor. *J Virol* **79**, 11901-13.
- Floegel-Niesmann, G., Bunzenthall, C., Fischer, S. und Moennig, V. (2003).** Virulence of recent and former classical swine fever virus isolates evaluated by their clinical and pathological signs. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **50**, 214-20.
- Fritzemeier, J., Haas, L., Liebler, E., Moennig, V. und Greiser-Wilke, I. (1997).** The development of early vs. late onset mucosal disease is a consequence of two different pathogenic mechanisms. *Arch Virol* **142**, 1335-50.
- Gallei, A., Blome, S., Gilgenbach, S., Tautz, N., Moennig, V. und Becher, P. (2008).** Cytopathogenicity of classical Swine Fever virus correlates with attenuation in the natural host. *J Virol* **82**, 9717-29.
- Gillespie, J. H., Baker, J. A. und Mc, E. K. (1960a).** A cytopathogenic strain of virus diarrhoea virus. *Cornell Vet* **50**, 73-9.
- Gillespie, J. H., Sheffy, B. E. und Baker, J. A. (1960b).** Propagation of hog cholera virus in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* **105**, 679-81.
- Ginzinger, D. G. (2002).** Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol* **30**, 503-12.
- Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R. und Mathieu, C. (2001).** An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* **25**, 386-401.
- Gong, Y., Shannon, A., Westaway, E. G. und Gowans, E. J. (1998).** The replicative intermediate molecule of bovine viral diarrhoea virus contains multiple nascent strands. *Arch Virol* **143**, 399-404.

- Gong, Y., Trowbridge, R., Macnaughton, T. B., Westaway, E. G., Shannon, A. D. und Gowans, E. J. (1996). Characterization of RNA synthesis during a one-step growth curve and of the replication mechanism of bovine viral diarrhoea virus. *J Gen Virol* **77** (Pt 11), 2729-36.
- Gosert, R., Egger, D., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Blum, H. E., Bienz, K. und Moradpour, D. (2003). Identification of the Hepatitis C Virus RNA Replication Complex in Huh-7 Cells Harboring Subgenomic Replicons. *J. Virol.* **77**, 5487-5492.
- Gray, E. W. und Nettleton, P. F. (1987). The Ultrastructure of Cell Cultures Infected with Border Disease and Bovine Virus Diarrhoea Viruses. *J. Gen. Virol.* **68**, 2339-2346.
- Greiser-Wilke, I., Dittmar, K. E., Liess, B. und Moennig, V. (1991). Immunofluorescence studies of biotype-specific expression of bovine viral diarrhoea virus epitopes in infected cells. *J Gen Virol* **72** (Pt 8), 2015-9.
- Griffith, J. M. und Posthuma, G. (2002). A reliable and convenient method to store ultrathin thawed cryosections prior to immunolabeling. *J Histochem Cytochem* **50**, 57-62.
- Griffiths, G. (2004). "The use of Electron Microscopy in Cell Biology". *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*. R. A. Meyers. Weinheim, Wiley.VCH. Vol. 4.
- Griffiths, G., McDowall, A., Back, R. und Dubochet, J. (1984). On the preparation of cryosections for immunocytochemistry. *J Ultrastruct Res* **89**, 65-78.
- Grummer, B., Beer, M., Liebler-Tenorio, E. und Greiser-Wilke, I. (2001). Localization of viral proteins in cells infected with bovine viral diarrhoea virus. *J. Gen. Virol.* **82**, 2597-2605.
- Grummer, B., Moennig, V. und Greiser-Wilke, I. (1998). Cytopathogenic bovine viral diarrhea viruses induce apoptosis in bovine cell culture. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschrift* **105**, 29-31.
- Harada, T., Tautz, N. und Thiel, H.-J. (2000). E2-p7 region of the bovine viral diarrhea virus polyprotein: processing and functional studies. *J Virol* **74**, 9498-506.
- Heimann, M., Roman-Sosa, G., Martoglio, B., Thiel, H.-J. und Rumenapf, T. (2006). Core protein of pestiviruses is processed at the C terminus by signal peptide peptidase. *J Virol* **80**, 1915-21.
- Hoff, H. S. und Donis, R. O. (1997). Induction of apoptosis and cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by cytopathic bovine viral diarrhea virus infection. *Virus Research* **49**, 101-113.
- Howard, C. J. (1990). Immunological responses to bovine virus diarrhoea virus infections. *Rev Sci Tech* **9**, 95-103.
- Iqbal, M., Poole, E., Goodbourn, S. und McCauley, J. W. (2004). Role for bovine viral diarrhea virus Erns glycoprotein in the control of activation of beta interferon by double-stranded RNA. *J Virol* **78**, 136-45.
- Jordan, R., Nikolaeva, O. V., Wang, L., Conyers, B., Mehta, A., Dwek, R. A. und Block, T. M. (2002a). Inhibition of Host ER Glucosidase Activity Prevents Golgi Processing of Virion-Associated Bovine Viral Diarrhea Virus E2 Glycoproteins and Reduces Infectivity of Secreted Virions. *Virology* **295**, 10-19.
- Jordan, R., Wang, L., Graczyk, T. M., Block, T. M. und Romano, P. R. (2002b). Replication of a Cytopathic Strain of Bovine Viral Diarrhea Virus Activates PERK and Induces Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Apoptosis of MDBK Cells. *J. Virol.* **76**, 9588-9599.
- Kahrs, R. F., Hillman, R. B. und Todd, J. D. (1973). Observations on the intranasal vaccination of pregnant cattle against infectious bovine rhinotracheitis and parainfluenza-3 virus infection. *J Am Vet Med Assoc* **163**, 437-41.
- Kao, C. C., Del Vecchio, A. M. und Zhong, W. (1999). De novo initiation of RNA synthesis by a recombinant flaviviridae RNA-dependent RNA polymerase. *Virology* **253**, 1-7.
- Kärber, G. (1931). Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch exp Pathol Pharmacol* **162**, 480.
- Kirkegaard, K., Taylor, M. P. und Jackson, W. T. (2004). Cellular autophagy: surrender, avoidance and subversion by microorganisms. *Nat Rev Microbiol* **2**, 301-14.
- Kirkland, P. D., Frost, M. J., Finlaison, D. S., King, K. R., Ridpath, J. F. und Gu, X. (2007). Identification of a novel virus in pigs--Bungowannah virus: a possible new species of pestivirus. *Virus Res* **129**, 26-34.
- Kolesnikova, L., Bamberg, S., Berghöfer, B. und Becker, S. (2004a). The Matrix Protein of Marburg Virus Is Transported to the Plasma Membrane along Cellular Membranes: Exploiting the Retrograde Late Endosomal Pathway. *J. Virol.* **78**, 2382-2393.
- Kolesnikova, L., Berghöfer, B., Bamberg, S. und Becker, S. (2004b). Multivesicular Bodies as a Platform for Formation of the Marburg Virus Envelope. *J. Virol.* **2004**, 12277-12287.

- Kolesnikova, L., Bugany, H., Klenk, H. D. und Becker, S. (2002).** VP40, the matrix protein of Marburg virus, is associated with membranes of the late endosomal compartment. *J Virol* **76**, 1825-38.
- König, M., Lengsfeld, T., Pauly, T., Stark, R. und Thiel, H.-J. (1995).** Classical swine fever virus: independent induction of protective immunity by two structural glycoproteins. *J Virol* **69**, 6479-86.
- Krey, T., Thiel, H.-J. und Rügenapf, T. (2005).** Acid-resistant bovine pestivirus requires activation for pH-triggered fusion during entry. *J Virol* **79**, 4191-200.
- Lackner, T., Müller, A., Pankraz, A., Becher, P., Thiel, H.-J., Gorbalenya, A. E. und Tautz, N. (2004).** Temporal modulation of an autoprotease is crucial for replication and pathogenicity of an RNA virus. *J Virol* **78**, 10765-75.
- Langedijk, J. P. (2002).** Translocation activity of C-terminal domain of pestivirus Erns and ribotoxin L3 loop. *J Biol Chem* **277**, 5308-14.
- Laude, H. (1979).** Nonarbo-togaviridae: comparative hydrodynamic properties of the pestivirus genus. Brief report. *Arch Virol* **62**, 347-52.
- Lecot, S., Belouzard, S., Dubuisson, J. und Rouille, Y. (2005).** Bovine viral diarrhoea virus entry is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* **79**, 10826-9.
- Lee, Y.-M., Tscherne, D. M., Yun, S.-I., Frolov, I. und Rice, C. M. (2005).** Dual Mechanisms of Pestiviral Superinfection Exclusion at Entry and RNA Replication. *J. Virol.* **79**, 3231-3242.
- Lin, C., Lindenbach, B. D., Pragai, B. M., McCourt, D. W. und Rice, C. M. (1994).** Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *J Virol* **68**, 5063-73.
- Lindenbach, B. D., Evans, M. J., Syder, A. J., Wolk, B., Tellinghuisen, T. L., Liu, C. C., Maruyama, T., Hynes, R. O., Burton, D. R., McKeating, J. A. und Rice, C. M. (2005).** Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* **309**, 623-6.
- Lindenbach, B. D. und Rice, C. M. (2001).** "Flaviviridae: The Viruses and Their Replication". *Fields Virology*. D. M. Knipe and P. M. Howley. Philadelphia, New York, Lippincott-Raven Publishers.: 991-1042.
- Liou, W., Geuze, H. J. und Slot, J. W. (1996).** Improving structural integrity of cryosections for immunogold labeling. *Histochem Cell Biol* **106**, 41-58.
- López Yomayaza, C. C. (2009).** Charakterisierung der Tollwutvakzinen "Rabipur" und "Rabivac" und der enthaltenen Virusstämme FluryLEP und PM 1503. Dissertation. Institut für Virologie, Justus-Liebig-Universität Giessen.
- Mackenzie, J. M. (2005).** Wrapping things up about virus RNA replication. *Traffic* **6**, 967-77.
- Mackenzie, J. M., Jones, M. K. und Westaway, E. G. (1999).** Markers for trans-Golgi Membranes and the Intermediate Compartment Localize to Induced Membranes with Distinct Replication Functions in Flavivirus-Infected Cells. *J. Virol.* **73**, 9555-9567.
- Mackenzie, J. M., Jones, M. K. und Young, P. R. (1996a).** Immunolocalization of the Dengue Virus Nonstructural Glycoprotein NS1 Suggests a Role in Viral RNA Replication. *Virology* **220**, 232-240.
- Mackenzie, J. M., Jones, M. K. und Young, P. R. (1996b).** Improved membrane preservation of flavivirus-infected cells with cryosectioning. *J Virol Methods* **56**, 67-75.
- Mackenzie, J. M. und Westaway, E. G. (2001).** Assembly and Maturation of the Flavivirus Kunjin Virus Appear To Occur in the Rough Endoplasmic Reticulum and along the Secretory Pathway, Respectively. *J. Virol.* **75**, 10787-10799.
- Macovei, A., Zitzmann, N., Lazar, C., Dwek, R. A. und Branza-Nichita, N. (2006).** Brefeldin A inhibits pestivirus release from infected cells, without affecting its assembly and infectivity. *Biochem Biophys Res Commun* **346**, 1083-90.
- Magkouras, I., Matzner, P., Rügenapf, T., Peterhans, E. und Schweizer, M. (2008).** RNase-dependent inhibition of extracellular, but not intracellular, dsRNA-induced interferon synthesis by Erns of pestiviruses. *J Gen Virol* **89**, 2501-6.
- Maurer, K., Krey, T., Moennig, V., Thiel, H.-J. und Rügenapf, T. (2004).** CD46 is a cellular receptor for bovine viral diarrhoea virus. *J Virol* **78**, 1792-9.
- McDowall, A. W., Chang, J. J., Freeman, R., Lepault, J., Walter, C. A. und Dubochet, J. (1983).** Electron microscopy of frozen hydrated sections of vitreous ice and vitrified biological samples. *J Microsc* **131**, 1-9.

- Meyers, G. und Thiel, H.-J. (1996). Molecular characterisation of pestiviruses. *Adv. Virus Res.* **47**, 53-118.
- Miller, R. H. und Purcell, R. H. (1990). Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 2057-61.
- Miller, S., Kastner, S., Krijnse-Locker, J., Buhler, S. und Bartenschlager, R. (2007). The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. *J Biol Chem* **282**, 8873-82.
- Mittler, E., Kolesnikova, L., Strecker, T., Garten, W. und Becker, S. (2007). Role of the transmembrane domain of marburg virus surface protein GP in assembly of the viral envelope. *J Virol* **81**, 3942-8.
- Möbius, W. (2009). Cryopreparation of biological specimens for immunoelectron microscopy. *Ann Anat* **191**, 231-47.
- Moradpour, D., Penin, F. und Rice, C. M. (2007). Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* **5**, 453-63.
- Morita, E. und Sundquist, W. I. (2004). Retrovirus budding. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 395-425.
- Müller, A., Rinck, G., Thiel, H.-J. und Tautz, N. (2003). Cell-derived sequences in the N-terminal region of the polyprotein of a cytopathogenic pestivirus. *J Virol* **77**, 10663-9.
- Murakami, K., Ishii, K., Ishihara, Y., Yoshizaki, S., Tanaka, K., Gotoh, Y., Aizaki, H., Kohara, M., Yoshioka, H., Mori, Y., Manabe, N., Shoji, I., Sata, T., Bartenschlager, R., Matsuura, Y., Miyamura, T. und Suzuki, T. (2006). Production of infectious hepatitis C virus particles in three-dimensional cultures of the cell line carrying the genome-length dicistronic viral RNA of genotype 1b. *Virology* **351**, 381-92.
- Murray, C. L., Jones, C. T. und Rice, C. M. (2008a). Architects of assembly: roles of Flaviviridae non-structural proteins in virion morphogenesis. *Nat Rev Microbiol* **6**, 699-708.
- Murray, C. L., Marcotrigiano, J. und Rice, C. M. (2008b). Bovine viral diarrhea virus core is an intrinsically disordered protein that binds RNA. *J Virol* **82**, 1294-304.
- Nettleton, P. F. (1990). Pestivirus infections in ruminants other than cattle. *Rev Sci Tech* **9**, 131-50.
- Nettleton, P. F., Gilmour, J. S., Herring, J. A. und Sinclair, J. A. (1992). The production and survival of lambs persistently infected with border disease virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **15**, 179-88.
- Orenstein, J. M. (2007). Replication of HIV-1 in vivo and in vitro. *Ultrastruct Pathol* **31**, 151-67.
- Pelchen-Matthews, A., Raposo, G. und Marsh, M. (2004). Endosomes, exosomes and Trojan viruses. *Trends Microbiol* **12**, 310-6.
- Pellerin, C., van den Hurk, J., Lecomte, J. und Tussen, P. (1994). Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology* **203**, 260-8.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45.
- Poole, T. L., Wang, C., Popp, R. A., Potgieter, L. N., Siddiqui, A. und Collett, M. S. (1995). Pestivirus translation initiation occurs by internal ribosome entry. *Virology* **206**, 750-4.
- Popescu, C. I. und Dubuisson, J. (2010). Role of lipid metabolism in hepatitis C virus assembly and entry. *Biol Cell* **102**, 63-74.
- Potgieter, L. N., McCracken, M. D., Hopkins, F. M. und Guy, J. S. (1985). Comparison of the pneumopathogenicity of two strains of bovine viral diarrhea virus. *Am J Vet Res* **46**, 151-3.
- Pritchard, W. R. (1963). The Bovine Viral Diarrhea-Mucosal Disease Complex. *Adv Vet Sci Comp Med* **41**, 1-47.
- Purchio, A. F., Larson, R., Torborg, L. L. und Collett, M. S. (1984). Cell-free translation of bovine viral diarrhea virus RNA. *J Virol* **52**, 973-5.
- Rebhun, W. C., French, T. W., Perdrietz, J. A., Dubovi, E. J., Dill, S. G. und Karcher, L. F. (1989). Thrombocytopenia associated with acute bovine virus diarrhea infection in cattle. *J Vet Intern Med* **3**, 42-6.
- Reynolds, E. S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* **17**, 208-12.
- Richter, K. (1994). Cutting artefacts on ultrathin cryosections of biological bulk specimens. *Micron* **25**, 297-308.

- Rijnbrand, R., van der Straaten, T., van Rijn, P. A., Spaan, W. J. und 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**, 451-7.
- Roman-Sosa, G. (2007).** Charakterisierung des Core-Proteins von Pestiviren. Dissertation. Institut für Virologie, Justus-Liebig-Universität Giessen.
- Rümenapf, T., Stark, R., Meyers, G. und Thiel, H.-J. (1991).** Structural proteins of hog cholera virus expressed by vaccinia virus: further characterization and induction of protective immunity. *J Virol* **65**, 589-97.
- Rümenapf, T. und Thiel, H.-J. (2008).** "Molecular Biology of Pestiviruses". *Animal Viruses: Molecular Biology*. T. C. Mettenleiter and F. Sobrino. Norfolk, UK, Caister Academic Press.
- Rümenapf, T., Unger, G., Strauss, J. H. und Thiel, H.-J. (1993).** Processing of the Envelope Glycoproteins of Pestiviruses. *J. Virol.* **67**, 3288-3294.
- Schirrmeier, H., Strebelow, G., Depner, K. R. und Beer, M. (2002).** "Heterogenicity of Pestiviruses: Determination and Characterisation of Novel Genotypes and Species." *5th European Society of Veterinary Virology Pestivirus Symposium*, St. John's College, Cambridge.
- Shannon, A. D., Richards, S. G., Kirkland, P. D. und Moyle, A. (1991).** An antigen-capture ELISA detects pestivirus antigens in blood and tissues of immunotolerant carrier cattle. *J Virol Methods* **34**, 1-12.
- Slot, J. W., Geuze, H. J., Gigengack, S., Lienhard, G. E. und James, D. E. (1991).** Immunolocalization of the insulin regulatable glucose transporter in brown adipose tissue of the rat. *J Cell Biol* **113**, 123-35.
- Stahl, K., Beer, M., Schirrmeier, H., Hoffmann, B., Belak, S. und Alenius, S. (2009).** Atypical 'HoBi'-like pestiviruses--recent findings and implications thereof. *Vet Microbiol* **142**, 90-3.
- Stark, R., Meyers, G., Rümenapf, T. und Thiel, H.-J. (1993).** Processing of pestivirus polyprotein: cleavage site between autoprotease and nucleocapsid protein of classical swine fever virus. *J Virol* **67**, 7088-95.
- Steffens, S., Thiel, H.-J. und Behrens, S. E. (1999).** The RNA-dependent RNA polymerases of different members of the family Flaviviridae exhibit similar properties in vitro. *J Gen Virol* **80** (Pt 10), 2583-90.
- Tajima, S., Takasaki, T. und Kurane, I. (2008).** Characterization of Asn130-to-Ala mutant of dengue type 1 virus NS1 protein. *Virus Genes* **36**, 323-9.
- Tautz, N., Elbers, K., Stoll, D., Meyers, G. und Thiel, H.-J. (1997).** Serine protease of pestiviruses determination of cleavage sites. *J. Virol.* **71**, 5412-5422.
- Tautz, N., Thiel, H.-J., Dubovi, E. J. und Meyers, G. (1994).** Pathogenesis of mucosal disease: a cytopathogenic pestivirus generated by an internal deletion. *J Virol* **68**, 3289-97.
- Terpstra, C. (1981).** Border disease: virus persistence, antibody response and transmission studies. *Res Vet Sci* **30**, 185-91.
- Tews, B. A. und Meyers, G. (2007).** The pestivirus glycoprotein Erns is anchored in plane in the membrane via an amphipathic helix. *J Biol Chem* **282**, 32730-41.
- Thiel, H.-J., Collett, M. S., Gould, E. A., Heinz, F. X., Houghton, M., Meyers, G., Purcell, R. H. und Rice, C. M. (2005).** "Family Flaviviridae". *Virus Taxonomy. VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger and L. A. Ball. San Diego, USA, Academic Press: pp. 979-996.
- Thiel, H.-J., Stark, R., Weiland, E., Rümenapf, T. und Meyers, G. (1991).** Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. *J Virol* **65**, 4705-12.
- Tokuyasu, K. T. (1973).** A technique for ultracryotomy of cell suspensions and tissues. *J Cell Biol* **57**, 551-65.
- Tokuyasu, K. T. (1976).** Membranes as observed in frozen sections. *J Ultrastruct Res* **55**, 281-7.
- Tokuyasu, K. T. (1978).** A study of positive staining of ultrathin frozen sections. *J Ultrastruct Res* **63**, 287-307.
- Tokuyasu, K. T. (1980).** Immunocytochemistry on ultrathin frozen sections. *Histochem J* **12**, 381-403.
- Tokuyasu, K. T. (1983).** Present state of immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem* **31**, 164-7.

- Tokuyasu, K. T. (1986).** Application of cryoultramicrotomy to immunocytochemistry. *J Microsc* **143**, 139-49.
- Tokuyasu, K. T. und Singer, S. J. (1976).** Improved procedures for immunoferritin labeling of ultrathin frozen sections. *J Cell Biol* **71**, 894-906.
- Tsukiyama-Kohara, K., Iizuka, N., Kohara, M. und Nomoto, A. (1992).** Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol* **66**, 1476-83.
- Unger, G. (1993).** Proteinbiochemische und strukturelle Analysen des Virus der klassischen Schweinepest Dissertation. Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- van Zijl, M., Wensvoort, G., de Kluyver, E., Hulst, M., van der Gulden, H., Gielkens, A., Berns, A. und Moormann, R. (1991).** Live attenuated pseudorabies virus expressing envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus protects swine against both pseudorabies and hog cholera. *J Virol* **65**, 2761-5.
- Vargas Teran, M., Calcagno Ferrat, N. und Lubroth, J. (2004).** Situation of classical swine fever and the epidemiologic and ecologic aspects affecting its distribution in the American continent. *Ann N Y Acad Sci* **1026**, 54-64.
- Vauloup-Fellous, C., Pene, V., Garaud-Aunis, J., Harper, F., Bardin, S., Suire, Y., Pichard, E., Schmitt, A., Sogni, P., Pierron, G., Briand, P. und Rosenberg, A. R. (2006).** Signal peptide peptidase-catalyzed cleavage of hepatitis C virus core protein is dispensable for virus budding but destabilizes the viral capsid. *J Biol Chem* **281**, 27679-92.
- Vilcek, E., Ahl, R., Stark, R., Weiland, F. und Thiel, H.-J. (2001).** "A novel pestivirus genotype isolated from pronghorn antelope. Nicht veröffentlicht. AF410791."
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Kräusslich, H.-G., Mizokami, M., Bartenschlager, R. und Liang, T. J. (2005).** Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nature medicine* **11**, 791-796
- Weiland, E., Ahl, R., Stark, R., Weiland, F. und 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., Rümenapf, T., Meyers, G. und Thiel, H.-J. (1990).** Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer. *J Virol* **64**, 3563-9.
- Weiland, E., Thiel, H.-J., Hess, G. und Weiland, F. (1989).** Development of monoclonal neutralizing antibodies against bovine viral diarrhea virus after pretreatment of mice with normal bovine cells and cyclophosphamide. *J Virol Methods* **24**, 237-43.
- Weiland, F., Weiland, E., Unger, G., Saalmüller, A. und Thiel, H.-J. (1999).** Localization of pestiviral envelope proteins Erns and E2 at the cell surface and on isolated particles. *J. Gen. Virol.* **80**, 1157-1165.
- Weiskircher, E., Aligo, J., Ning, G. und Konan, K. V. (2009).** Bovine viral diarrhea virus NS4B protein is an integral membrane protein associated with Golgi markers and rearranged host membranes. *Virol J* **6**, 185.
- Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C. K., Walther, P., Fuller, S. D., Antony, C., Krijnse-Locker, J. und Bartenschlager, R. (2009).** Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe* **5**, 365-75.
- Welsch, S., Muller, B. und Kräusslich, H. G. (2007).** More than one door - Budding of enveloped viruses through cellular membranes. *FEBS Lett* **581**, 2089-97.
- Westaway, E. G., Khromykh, A. A., Kenney, M. T., Mackenzie, J. M. und Jones, M. K. (1997a).** Proteins C and NS4B of the Flavivirus Kunjin Translocate Independently into the Nucleus. *Virology* **234**, 31-41.
- Westaway, E. G., Mackenzie, J. M., Kenney, M. T., Jones, M. K. und Khromykh, A. A. (1997b).** Ultrastructure of Kunjin Virus-Infected Cells: Colocalization of NS1 and NS3 with Double-Stranded RNA, and of NS2B with NS3, in Virus-Induced Membrane Structures. *J. Virol.* **71**, 6650-6661.
- Wiskerchen, M., Belzer, S. K. und Collett, M. S. (1991).** Pestivirus gene expression: the first protein product of the bovine viral diarrhea virus large open reading frame, p20, possesses proteolytic activity. *J Virol* **65**, 4508-14.

- Xu, J., Mendez, E., Caron, P. R., Lin, C., Murcko, M. A., Collett, M. S. und Rice, C. M. (1997).** Bovine viral diarrhea virus NS3 serine proteinase: polyprotein cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of an enzyme essential for pestivirus replication. *J Virol* **71**, 5312-22.
- Zhang, G., Aldridge, S., Clarke, M. C. und McCauley, J. W. (1996).** Cell death induced by cytopathic bovine viral diarrhoea virus is mediated by apoptosis. *J Gen Virol* **77 (Pt 8)**, 1677-81.
- Zhong, J., Gastaminza, P., Sharookh, K., Kato, T., Burton, D. R., Wieland, S. F., Uprichard, S. L., Wakita, T. und Chisari, F. V. (2005).** Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 9294-9299.
- Zhong, W., Gutshall, L. L. und Del Vecchio, A. M. (1998).** Identification and characterization of an RNA-dependent RNA polymerase activity within the nonstructural protein 5B region of bovine viral diarrhea virus. *J Virol* **72**, 9365-9.

Teile dieser Arbeit wurden bereits auf folgenden Kongressen vorgestellt:

1. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, München, 15.-18. März 2006
Posterpräsentation:
S. Deike, M. König and H.-J. Thiel
„Morphology and morphogenesis of pestiviruses“
2. 14th European Microscopy Congress (EMC 2008), Aachen, 1.-5. September 2008
Vortrag:
S. Deike, M. König and H.-J. Thiel
“Assembly and maturation of pestiviruses”
3. Internationaler Workshop: “Electron Microscopy (EM) in Infectious Diseases and Pathogen Research (Glienicke-Workshop 2008)”, Berlin, 6./7. November 2008
Eingeladener Vortrag:
S. Deike, M. König and H.-J. Thiel
“Immunogoldlabeling of cryosections - Exploring the Tokuyasu technique”
4. European Society for Veterinary Virology (ESVV), 8th International Congress of Veterinary Virology, Budapest, 23.-26. August 2009
Vortrag:
S. Schmeiser, M. König and H.-J. Thiel
“Assembly and maturation of pestiviruses - observations at ultrastructural level”

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde am Institut für Virologie, Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen unter der Betreuung von Prof. Dr. H. - J. Thiel angefertigt. Diese Arbeit wurde in Teilen durch die “Stiftung der Eheleute Dr. med. vet. Hans-Joachim und Gertrud Engemann” der Justus-Liebig-Universität Giessen gefördert.

Ich danke an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. H. - J. Thiel für die Überlassung des Themas dieser Dissertation und für die langjährige Förderung, Betreuung und Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Matthias König für die Idee zu dieser Arbeit und für unendlichen Enthusiasmus, Hilfsbereitschaft, Geduld und Vertrauen im Verlauf dieses Projekts. Ich nehme aus dieser Zeit weit mehr mit als nur die Begeisterung für Elektronenmikroskopie, die du in mir geweckt hast.

Ich danke Prof. Paul Becher für die Möglichkeit zur Durchführung der Transfektionsexperimente in seiner Arbeitsgruppe, für stete Gesprächs- und Diskussionsbereitschaft sowie für einen wegweisenden Blick in meine berufliche Zukunft.

Ferner bedanke ich mich bei Prof. Tillman Rümenapf für die Bereitstellung von Zelllinien und Antikörpern sowie für die stete Diskussionsbereitschaft in Bezug auf mein Projekt.

Mein Dank geht ebenfalls an Dr. Martin Hardt aus der ZBB der JLU Giessen für die freundliche Bereitstellung der technischen Möglichkeiten zur Kryoultramikrotomie und vor allem Anna Möbus für die tatkräftige Unterstützung bei der Probenpräparation.

Ich danke Heidrun Will für die Einarbeitung in die Elektronenmikroskopie und für die gute Zusammenarbeit im EM-Labor sowie Kerstin Göbler, Jochen Lowitzer und Renate Neidhardt für die freundliche Aufnahme im Diagnostischen Labor und für die stete Hilfsbereitschaft in allen Belangen.

Ich möchte mich sehr gern bei Dr. Wiebke Möbius vom MPI für experimentelle Medizin in Göttingen für eine tolle Einführung in die Kryoultramikrotomie und für ihre freundliche Unterstützung bei der Beantwortung vieler weiterer Fragen bedanken.

Ganz besonders danke ich Babsi, Deborah und Tine für jedwede Form der Unterstützung in jeder Phase meiner Arbeit. Ihr habt mir in guten und schlechten Zeiten beigestanden und ich vermisse euch schrecklich.

Ein lieber Dank geht ebenfalls an meine Kollegen Alex, Claudia, Dominique, Gleyder, Jessica und Moni, für eine schöne Zeit, eine gute Arbeitsatmosphäre und oftmals die richtigen Worte im richtigen Augenblick.

Ein großes Dankeschön auch an Mirjam Lang und Stephanie Schumacher, für den gemeinsamen Gang durch alle Höhen und Tiefen der Dissertation, eure Freundschaft und schließlich für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Ich danke meinen lieben Freundinnen Hannah und Tatjana dafür, dass ihr mich schon so lange und auch durch diesen Lebensabschnitt begleitet habt, für euer offenes Ohr und für eure Freundschaft.

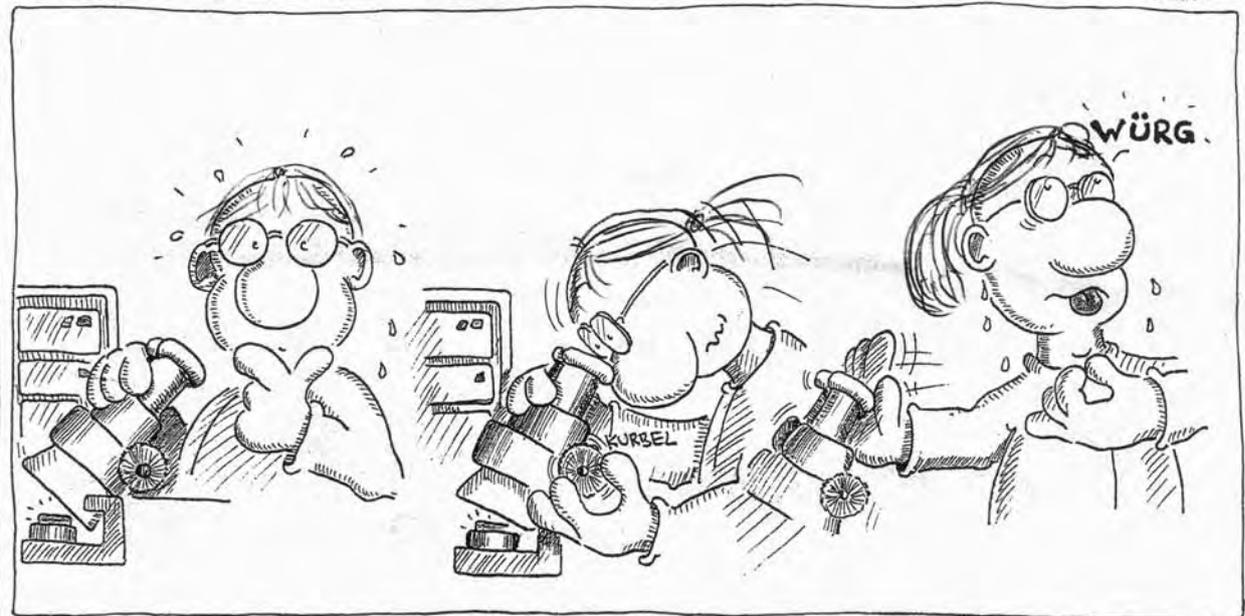
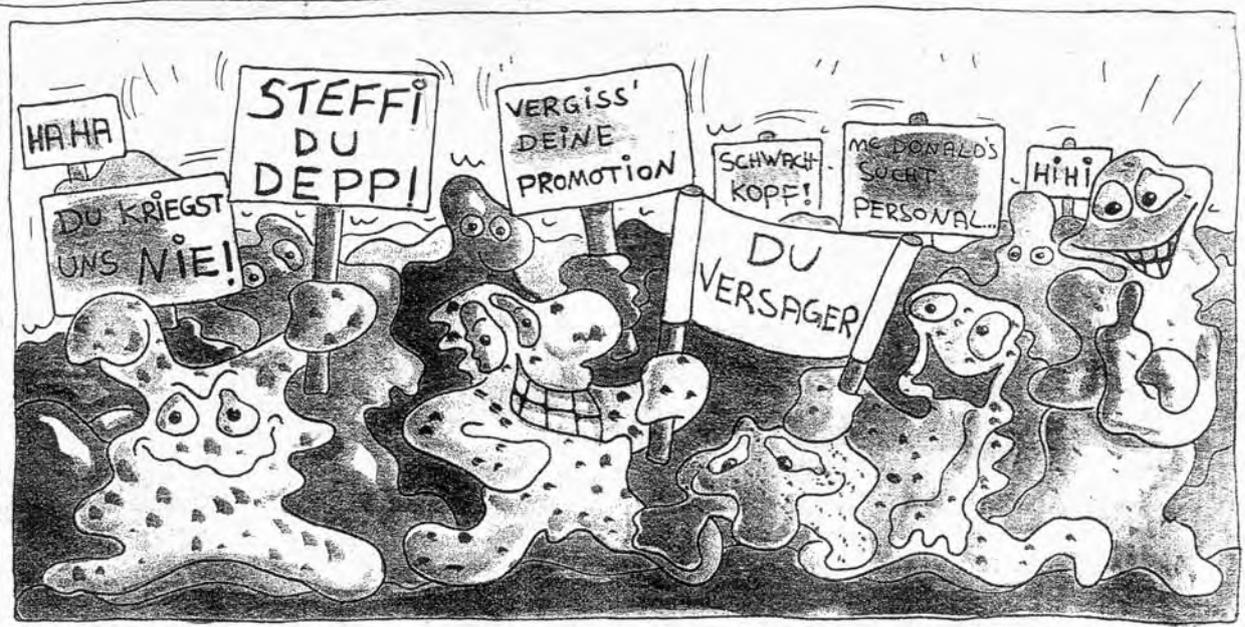
Ich danke meinen Eltern dafür, dass sie mir das Studium und das Promotionsstudium ermöglicht haben und für die Unterstützung während dieser Zeit.

Ein herzlicher Dank geht auch an meine Oma Liesel für das lebhafteste Interesse an meiner Doktorarbeit, viele anregende Diskussionen sowie den besonderen Doktorhut!

Tim, ich danke dir für dein Interesse an meiner Arbeit, deine Unterstützung und den Halt, den du mir gegeben hast. Ich danke dir sehr für dein Verständnis während der Fertigstellung dieser Arbeit und verspreche dir, in Zukunft meinen Urlaub nicht mehr mit Pestiviren zu verbringen.

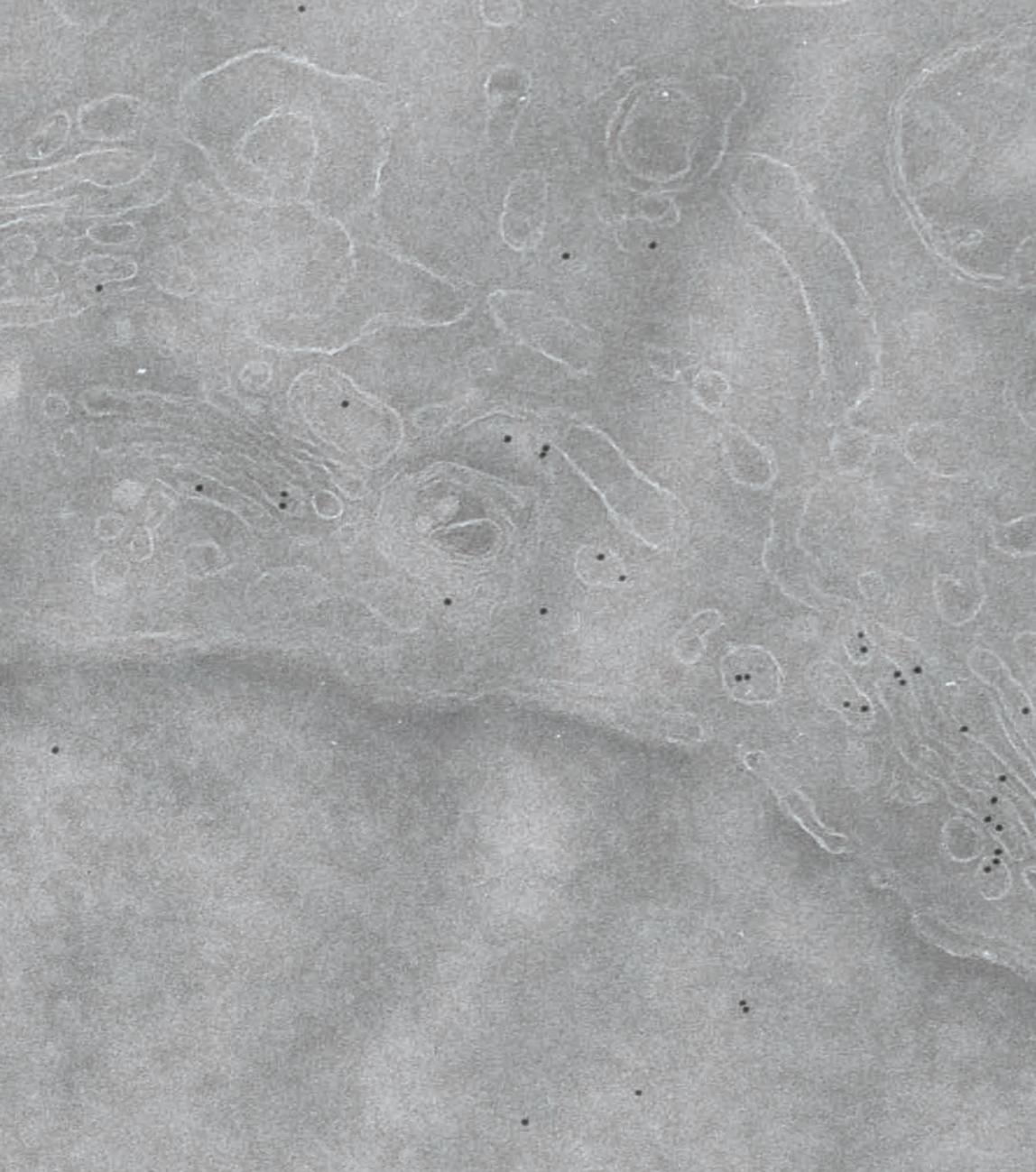
Last but not least:

Danke auch an das TEM 910, dafür dass du immer zuverlässig mitgearbeitet hast (bis auf den Wasserschaden im Herbst 2008); dank dir war der Zauberlehrling nie „allein im Dunkeln“.



HAB EUCH DOCH
GEKRIEGT!





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: 978-3-8359-5701-5


9 783835 115570 1 5