

**Einfluss von Mutationen auf  
die NS2/3-Prozessierung und  
die Zytogenität von Pestiviren**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie  
der Eberhard Karls Universität Tübingen

vorgelegt von  
Roger Bernhard  
aus Koblenz

2005

Tag der mündlichen Prüfung: 11.03.2005

Dekan: Prof. Dr. F. Schöffl

1. Berichterstatter: PD Dr. G. Meyers

2. Berichterstatter: Prof. Dr. V. Hemleben

## Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von PD Dr. G. Meyers am Institut für Immunologie des Friedrich-Löffler-Instituts, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit (ehemals Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, BFAV), in Tübingen (örtlicher Leiter: Prof. Dr. L. Stitz) angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. G. Meyers für die Überlassung des interessanten Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie seine fachliche Betreuung und seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft und

Frau Prof. Dr. V. Hemleben, die sich freundlicherweise dazu bereit erklärt hat, das Zweitgutachten für diese Arbeit anzufertigen.

Meinen Kolleginnen Maren Ziegler, Janett Wieseler und Petra Wulle danke ich für die Einarbeitung in die molekularbiologischen Techniken, ihre hervorragende technische Unterstützung, ihre selbstverständliche, menschliche Art, das ausserordentlich gute Arbeitsklima und die unendlich vielen kleinen Hilfen.

Darüber hinaus gilt mein Dank Karina Mildner für ihr unerschöpfliches Engagement bei der Durchsicht dieser Arbeit und dem Ausgleichen der individuellen Ausdrucksweisen sowie ihrem seelisch-moralischen Beistand.

Ebenso sei Dank meinen Kollegen Andreas Ege, Christine Luttermann und Birke Tews für den unkomplizierten Umgang und die entspannte Arbeitsatmosphäre sowie Andrea Braun, Ursula Csacsko, Solveig Daecke, Gabriele Kuebart und Daniel Wienhold für das freundschaftliche Arbeitsverhältnis, ihre fachliche Unterstützung sowie den köstlichen Gerichte und den Rotwein.

Herrn Wilfried Kramer herzlichen Dank für die Mithilfe bei der Erstellung der Abbildungen. Dank aber auch allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Immunologie des Friedrich-Löffler-Instituts, Tübingen, insbesondere Frau Christine Hepper und Herrn Hubert Ibal, deren Arbeit nicht hoch genug eingeschätzt werden kann.

Herzlichen Dank auch meinen Eltern für ihre fortwährende Unterstützung und ihr stetes Interesse.



---

## Inhaltsverzeichnis

Danksagungen		
Inhaltsverzeichnis	I	
Abkürzungen	VI	
<b>1. Einführung</b>	<b>1</b>	
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>11</b>	
2.1	Material	11
2.1.01	Geräte	11
2.1.02	Verbrauchsmaterial	13
2.1.03	Reagenzien	14
2.1.04	Radiochemikalien	17
2.1.05	Oligonukleotide	18
2.1.06	Enzyme	18
2.1.07	Kits	19
2.1.08	Antiseren und monoklonale Antikörper	19
2.1.8.1	Antiseren	19
2.1.8.2	Monoklonale Antikörper	20
2.1.09	Bakterienstämme	20
2.1.10	Plasmide	20
2.1.11	Zellen und Virusstämme	21
2.1.11.1	Zellen	21
2.1.11.2	Virusstämme	21
2.1.12	Zellkulturmedien	21
2.1.13	Stammlösungen und Medien	22
2.2	Methoden	26
2.2.01	Gewebekultur	26
2.2.01.1	Infektion von MDBK- und SK6-Zellen	26
2.2.01.2	Bestimmung der Zahl lebender Zellen	26
2.2.01.3	Titration und Titerberechnung	27
2.2.01.4	Indirekte Immunfluoreszens	28

2.2.01.5	Transfektion von RNA in MDBK-Zellen	28
2.2.01.6	Kristallviolett-färbung	29
2.2.01.7	Metabolische Markierung viraler Proteine	29
2.2.02	Transiente Expression viraler Proteine im T7-Vacciniavirus-System	29
2.2.02.1	Radioaktive <i>in vivo</i> Markierung transient transfizierter Zellen	30
2.2.03	Mikrobiologische Methoden	30
2.2.03.1	Anzucht von Bakterien	30
2.2.03.2	Dauerkulturen	30
2.2.03.3	Herstellung transformationskompetenter Bakterien	30
2.2.03.4	Hitzeschock-Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien	31
2.2.03.5	Plasmidpräparation für Test-/Kontrollzwecke	31
2.2.03.6	Plasmidpräparation zur Gewinnung größerer DNA-Mengen	32
2.2.04	Spektrophotometrische Analyse von Nukleinsäuren	33
2.2.05	Methoden zur Isolierung und Analyse von RNA	33
2.2.05.01	DEPC-Behandlung von Lösungen	33
2.2.05.02	RNA-Isolierung aus Zellen	33
2.2.05.03	RNA-Isolierung aus Zellen (peqGOLD Trifast™)	34
2.2.05.04	RNA-Agarosegelelektrophorese	34
2.2.05.05	Northern Blot	35
	2.2.05.5.1 Transfer von RNA auf Filter	35
	2.2.05.5.2 RNA/DNA-Hybridisierung	36
2.2.06	Standard DNA-Techniken	37
2.2.06.01	Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren	37
2.2.06.02	Ethanol-fällung von DNA	37
2.2.06.03	Isopropanol-fällung von DNA	37
2.2.06.04	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	37
2.2.06.05	Herstellung glatter Enden an DNA-Molekülen	38
2.2.06.06	Dephosphorylierung von DNA	38

2.2.06.07	Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase	39
2.2.06.08	DNA-Agarosegelelektrophorese	39
2.2.06.09	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	39
2.2.06.10.	Radioaktive Markierung von DNA durch „Nick“-Translation	40
2.2.06.11	Gelfiltration von Nukleinsäuren	40
2.2.07	Polymerasekettenreaktion (PCR)	41
2.2.07.1	Reverse Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	41
2.2.07.2	Polymerasekettenreaktion (PCR)	42
2.2.07.3	Quantitativ kompetitive PCR	43
2.2.08	Sequenzierung von DNA	43
2.2.08.1	Sequenzierung von Plasmid-DNA	43
2.2.08.2	Elektrophorese von Sequenzreaktionen im Harnstoff-Acrylamid-Gel	44
2.2.09	Gerichtete Mutagenese	45
2.2.10	<i>In vitro</i> Transkription	45
2.2.11	Proteinanalytische Methoden	46
2.2.11.1	Radioimmunpräzipitation	46
2.2.11.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	47
2.2.11.3	Gelbehandlung und Fluorografie	49
2.2.12	Western Blot	50
2.2.13	Software	50
<b>3. Ergebnisse</b>		<b>51</b>
3.1	NS2/3-Spaltung bei CSFV	51
3.1.1	Spalteffizienzen bei verschiedenen CSFV-Typen	51
3.1.1.1	Nachweis der Expression des NS3	51
3.1.2	Einführung von Mutationen an der NS2/3-Spaltstelle	53
3.1.2.1	Gerichtete Mutagenese	53
3.1.2.2	Einführung von Mutationen in den CSFV-Klon p1230b	54

3.1.2.3	Einführung von Mutationen in den CSFV-Gesamtklon (p1347)	55
3.1.3	Austausch der Promotorregion im p1347	57
3.1.4	Einführung von Mutationen in den CSFV-Gesamtklon (pRB50)	58
3.1.4.1	Transiente Expression mutierter CSFV-Klone	58
3.1.4.2	Eigenschaften <i>in vitro</i> transkribierter RNA der CSFV-Mutanten auf Basis des pRB50	59
3.1.4.3	Spalteffizienzen der verschiedenen CSFV-Mutanten	61
3.2	NS2/3 Spaltung bei BVDV Oregon	63
3.2.1	Herstellung eines T7-Expressionskonstruktes	63
3.2.2	Transiente Vaccinia-Expression mutierter Oregon-Klone	65
3.2.3	Spalteffizienzen der Mutanten im Expressionsklon p165	66
3.2.4	Lebensfähigkeit der Mutanten	68
3.3	Einführung einer Mutation im NS4B	70
3.3.1	Konstrukte zur Einführung einer Mutation im NS4B	70
3.3.2	Erzeugung und Analyse von Viren mit der NS4B Mutation	72
3.3.3	Stabilität der Mutanten im jeweiligen Gesamtklon	75
3.3.4	Überprüfung der NS2/3 Spaltung der NS4B-Mutanten	79
3.3.5	Spalteffizienz der NS4B-Mutanten im Vergleich zum zp Wildtyp	80
3.3.6	Überprüfung der RNA-Menge	81
3.3.6.1	Konstrukt zur Quantifizierung	82
3.3.6.2	Quantitativ-kompetitive RT-PCR	82
3.4	Bicistronischer Vektor	87
3.4.1	Konstruktaufbau	87
3.4.2	Lebensfähigkeit des veränderten DI9c	90
3.4.3	Konstrukt mit separiertem NS2 und NS3	90
3.4.4	Insertion antiapoptotischer Proteine	91

<b>4. Diskussion</b>	<b>95</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>110</b>
<b>6. Literatur</b>	<b>113</b>
Anhang	123

## Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
A. dest	„Aqua destillata“ (destilliertes Wasser)
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BFAV	Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere
BHK-21	„baby hamster kidney cells“ (Hamsternierenzellen)
bp	Basenpaar
BSA	„bovine serum albumin“ (Rinderserumalbumin)
BVDV	„bovine viral diarrhoea virus“ (Virus der bovinen viralen Diarrhöe)
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
Cam	Chloramphenicol
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-1-propan-sulfonsäure
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
CIP	„calf intestinal phosphatase“
cm	Zentimeter
cpm	„counts per minute“ (Zählrate per Minute)
CSFV	„classical swine fever virus“ (Virus der klassischen Schweinepest)
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxyterminus
CTP	Cytidintriphosphat
-Cys	ohne Cystein
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEAE	Diethylaminoethan
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
VI	

---

DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DOC	Natriumdesoxycholat
ds	Doppelstrang
DTT	1,4-Dithio-threitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	1,2-Bis-(2-Aminoethoxy-ethan)-Tetraessigsäure
EMCV	Encephalomyocarditis-Virus
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FCS	„fetal calf serum“ (fötales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G	Guanin
g	- Gramm - Erdbeschleunigung
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HAc	Essigsäure
HCl	Salzsäure
Hel	Helikase
HEPES	2-[4-(2-Hydroxy-ethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalakto-pyranosid
IRES	„internal ribosome entry site“ (cap-unabhängige Ribosomen-Bindungsstelle einer mRNA)
KAc	Kaliumacetat
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
KOP-R	Ösophaguszellen aus dem Rind

## ABKÜRZUNGEN

---

I	Liter
LB	Luria-Bertrani
Log	Logarithmus
M	Molar
mAK	monoklonale(r) Antikörper
MD	„mucosal disease“
MDBK	„Marbin Darby Bovine Kidney Cells“ (Rindernierenzellen)
-Met	ohne Methionin
MG	Molekulargewicht
min	Minute
m.o.i.	„multiplicity of infection“ (Viruspartikel/Zelle)
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MVA	modifiziertes Vaccinia-Virus, Stamm Ankara
NaAC	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NSP	Nichtstruktur-Protein
nt	Nukleotid
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Aminoterminus
NTR	„non-translated region“ (nicht translatierte Region)
nzp	nicht zytopathogen
OD	Optische Dichte
ORF	„open reading frame“ (offener/s Leserahmen /-Raster)
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	„phosphate buffered saline“ (Phosphat gepufferte Saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pfu	„plaque forming unit“ (infektiöse Einheiten)
p. i.	post infectionem
PIPES	Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfon-säure)
PO	Peroxidase
Pol	Polymerase
Pro	Protease

PVDF	Polyvinylidendifluorid
rGTP	GTP mit Ribose als Zuckeranteil
RNA-Pol	RNA-abhängige RNA-Polymerase
RIP	Radioimmunpräzipitation
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse PCR
SAP	„shrimps alkaline phosphatase“ (Schrimps Alkalische Phosphatase)
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SK6	“swine kidney cells” (Schweinenierenzellen)
SSC	„sodium chloride/sodium citrate (buffer)“ Kochsalz-Citrat-Puffer
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TCP	Trypsin-ähnliche Cystein-Protease
TE	Tris-EDTA-Lösung
TEMED	N, N, N', N'-Trismethyl-ethylendiamin
TENS	Tris-EDTA-Natronlauge-SDS-Lösung für DNA-Präparationen
Tet	Tetracyclin
Tricin	N-Tris(hydroxy-methyl)-methyl-glycin
Tris	Tris(hydroxyl-methyl)-aminoethan
TS	Transkriptionspuffer
U	„units“ (Enzymeinheiten)
Ub	Ubiquitin
UCH	“Ubiquitin-C-terminal-hydrolase” (Hydrolasen, die C-Terminal des Ubiquitinmoleküls spalten)
UpM	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett

## ABKÜRZUNGEN

---

VP	Virusprotein
% v/v	Volumenprozent
% w/v	Gewichtsprozent
wt	Wildtyp
zp	zytopathogen
ZPE	zytopathogener Effekt

### Aminosäuren (Ein-Buchstaben-Code):

A	Alanin	I	Isoleucin	R	Arginin
C	Cystein	K	Lysin	S	Serin
D	Asparaginsäure	L	Leucin	T	Threonin
E	Glutaminsäure	M	Methionin	V	Valin
F	Phenylalanin	N	Asparagin	W	Tryptophan
G	Glycin	P	Prolin	Y	Tyrosin
H	Histidin	Q	Glutamin		

Nicht erklärt werden Abkürzungen und Akronyme, die Eigennamen oder Handelsmarken darstellen.

## 1. Einführung

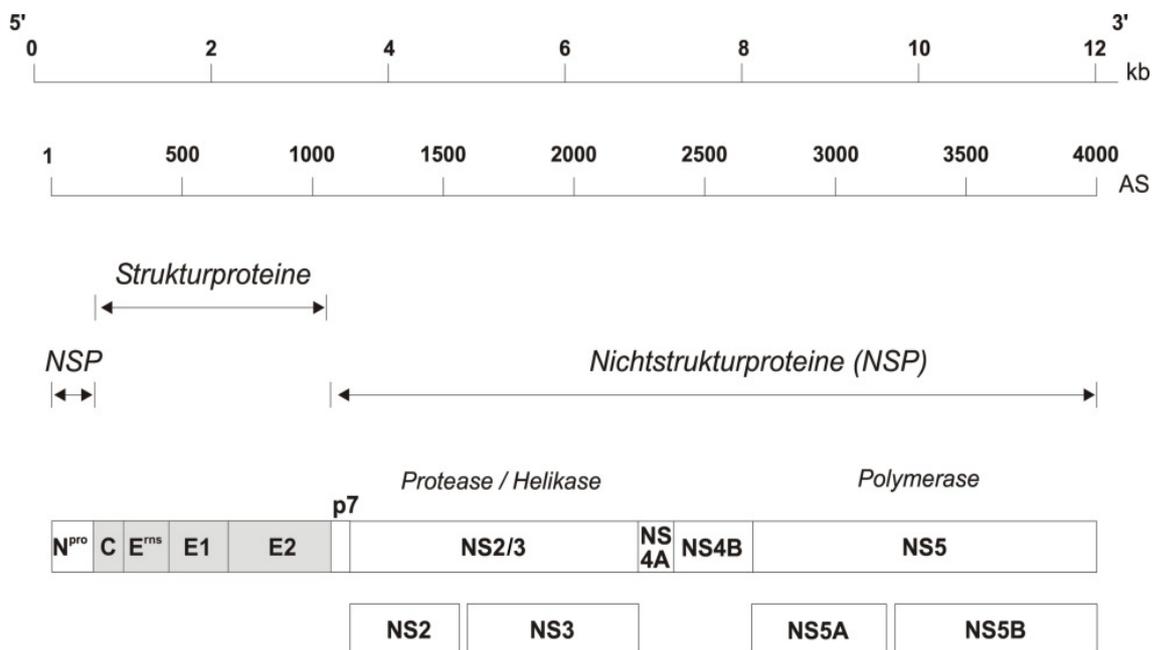
Die vorliegende Dissertation befasst sich mit verschiedenen Aspekten der Molekularbiologie von Pestiviren. Als Pestiviren werden drei veterinärmedizinisch relevante Erreger bezeichnet. Es handelt sich dabei um das Virus der bovinen viralen Diarrhöe („bovine viral diarrhea virus“, BVDV), das Virus der klassischen Schweinepest („classical swine fever virus“, CSFV) und das „border disease“ Virus (BDV) des Schafes. Vom BVDV werden aufgrund genetischer Unterschiede zwei Typen unterschieden, die als Spezies BVDV-1 und BVDV-2 benannt werden. Wegen ihrer Genomorganisation und Expressionsstrategie werden die Pestiviren als Genus *Pestivirus* der Familie *Flaviviridae* zugeordnet, welche darüber hinaus die Genera *Flavivirus* und *Hepacivirus* umfasst (Wengler G. et al. 1995; Heinz et al. 2000).

Pestiviruspartikel sind umhüllt und haben einen Durchmesser von 40-60 nm (Thiel, Plagemann, and Moennig 1996). Das ikosaedrische Kapsid, welches das virale RNA Genom enthält, hat einen Durchmesser von ca. 30 nm (Horzinek, Reczko, and Petzoldt 1967). Die lipidhaltige Hülle ermöglicht die Inaktivierung der Pestiviren mit chemischen Lösungsmitteln wie Chloroform und Ether oder mit Detergentien. Das Einwirken von UV-Strahlen, proteolytischen Enzymen, Hitze und niedrigen pH-Werten auf diese Viren führt ebenfalls zu einer Reduktion der Infektiosität (Liess 1981; Moennig V. 1988; Depner, Bauer, and Liess 1992).

Das Verhalten in der Zellkultur lässt zwei Biotypen unterscheiden. Nichtzytopathogene (nzp) Pestiviren vermehren sich ohne sichtbare Veränderungen in den Kulturzellen, während zytopathogene (zp) Viren im Verlauf ihrer Replikation zu einer Lyse der Zellen führen, die man als zytopathogenen Effekt (ZPE) bezeichnet (Baker 1987).

Das im Normalfall 12,3 kb lange, einzelsträngige RNA-Genom der Pestiviren liegt in positiver Orientierung vor. Es ist an seinem 3'-Ende weder polyadenyliert noch findet sich an seinem 5'-Ende eine „cap-Struktur“ (Renard et al. 1987; Collett et al. 1988a; Meyers, Rügenapf, and Thiel 1989a; Moormann et al. 1990; Deng and Brock 1992; Brock, Deng, and Riblet 1992). Die virale RNA enthält einen einzigen offenen Leserahmen, der beiderseits von nicht kodierenden Sequenzen flankiert wird und für ein Polyprotein von etwa 4000 Aminosäuren kodiert (Collett et al. 1988a; Wengler G. et al. 1995; Meyers,

Rümenapf, and Thiel 1989a; Moormann et al. 1990; Deng and Brock 1992; Deng and Brock 1993). Eine in der 5'-nichtkodierenden Region lokalisierte interne Ribosomen-Bindestelle („internal ribosomal entry side“, IRES) vermittelt die Initiation der Translation (Poole et al. 1995;Rijnbrand et al. 1997). Schon während der Translation beginnt die Prozessierung des entstehenden Polyproteins durch wirtszell- und viruskodierte Proteasen (Abb.1) (Collett et al. 1988b; Collett, Anderson, and Retzel 1988c; Rümenapf et al. 1993; Stark et al. 1993).



**Abb.1: Schematische Darstellung der Genomorganisation der Pestiviren**

Die unterschiedlichen Balkenabschnitte entsprechen im Verhältnis den Größen der verschiedenen viralen Proteine. Die farblich hervorgehobenen Strukturproteine (C, E<sup>rns</sup>, E1 und E2) werden von den Nichtstrukturproteinen (NSP) flankiert. Teilweise wird das NS2/3-Protein in NS2 und NS3 gespalten. Bei BVD-Viren korreliert das Auftreten von NS3 nach der Initialphase der Infektion mit dem zp Phänotyp. Ebenso wird das Protein NS5 in die Untereinheiten NS5A und NS5B gespalten.

Das Nichtstrukturprotein N<sup>pro</sup> befindet sich am Aminoterminus des Polyproteins, spaltet sich autokatalytisch von diesem ab und erzeugt somit den N-Terminus des nachfolgenden Kapsidproteins (C) (Stark et al. 1993). Die Translokation der an C anschließenden Strukturglykoproteine E<sup>rns</sup>, E1 und E2 in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) wird durch eine am C-Terminus des C-Proteins lokalisierte Signalsequenz initiiert. Durch zelluläre Signalpeptidasen erfolgt dort die Trennung zwischen C/E<sup>rns</sup> und E1/E2 (Rümenapf et al. 1993). Die Spaltung zwischen E<sup>rns</sup> und E1 könnte ebenfalls durch die Signalpeptidase

erfolgen, allerdings fehlen Teile des erforderlichen Sequenzmotivs, so dass weitere Untersuchungen diese Frage klären müssen. Die Aminotermini des Kapsidproteins und der Glykoproteine konnten durch Proteinsequenzierung definiert werden (Stark et al. 1993; Rügenapf et al. 1993). Am Carboxyterminus der Strukturglykoproteine E1 und E2 befinden sich hydrophobe Sequenzen, die vermutlich als Membrananker dienen (van Zijl et al. 1991; Rügenapf et al. 1993). Der Mechanismus, durch welchen das E<sup>rns</sup>-Protein mit dem Virion verbunden ist, konnte noch nicht geklärt werden. Allen Strukturglykoproteinen gemein ist die Bildung von Dimeren über Disulfidbrücken. Hierbei ergeben sich E<sup>rns</sup>- und E2-Homodimere sowie E1/E2-Heterodimere (Thiel et al. 1991). E<sup>rns</sup> trägt seine Bezeichnung aufgrund seiner Fähigkeit RNA abzubauen und der Tatsache, dass das Protein von infizierten Zellen sekretiert wird (rns = RNase secreted) (Schneider et al. 1993; Hulst et al. 1994; Windisch et al. 1996).

Auf das letzte Strukturprotein E2 folgen im viralen Polyprotein die Proteine p7, NS2/3 (p125), NS4A (p10), NS4B (p30) und NS5 (p130). Das durch die Spaltung durch Signalpeptidasen erzeugte Aminoende des nur sieben kD großen p7-Proteins konnte für BVD-Viren nachgewiesen werden (Elbers et al. 1996). Das Molekül war nur in infizierten Zellen zu finden und stellt somit wie die folgenden Proteine ein Nichtstrukturprotein (NSP) dar (Elbers et al. 1996).

Das auf p7 folgende Protein NS2/3 wird teilweise in NS2 (p44 – p54) und NS3 (p80) gespalten (Collett et al. 1988b; Thiel et al. 1991; Meyers et al. 1991a; Meyers et al. 1992; Becher et al. 1994; Becher et al. 1996; Lackner et al. 2004). Diese Spaltung findet während der Initialphase der Infektion sowohl bei nzp - wie auch zp Biotypen statt. Die Prozessierung erfolgt durch eine im NS2 lokalisierte Protease; bei einer Reihe natürlich vorkommender zp BVDV-Mutanten wird die Prozessierung auch durch andere Proteasen vorgenommen (s.u.). Die Freisetzung des NS3 wird im weiteren Verlauf der Infektion bei nzp Biotypen herunterreguliert. Die unkontrollierte, d.h. während der gesamten Infektion anhaltende Expression des NS3 führt bei BVD-Viren im Allgemeinen zum Auftreten des zp Phänotyps (Donis and Dubovi 1987; Pocock et al. 1987; Lackner et al. 2004). Jedoch konnten Mutanten erzeugt werden, bei denen trotz anhaltender Expression von NS3 kein ZPE in der Zellkultur auftrat (Qu, McMullan, and Rice 2001).

Das NS3 weist Proteaseaktivität auf und bewirkt die Prozessierung aller C-terminal dem NS2/3 folgenden Nichtstrukturproteine (Wiskerchen and Collett 1991; Tautz et al. 1997; Xu et al. 1997). Weiterhin konnte für NS3 noch eine NTPase- und Helikaseaktivität nachgewiesen werden (Warrener, Tamura, and Collett 1993; Warrener and Collett 1995).

Für das dem NS2/3 folgende Eiweiß NS4A konnte eine Rolle als Co-Faktor der NS3-Protease gezeigt werden (Xue, Zhang, and Minocha 1997; Tautz, Kaiser, and Thiel 2000).

Die Funktion des NS4B konnte noch nicht geklärt werden. Bei den mit Pestiviren nahe verwandten humanen Hepatitis C Viren (HCV) wurde gezeigt, dass dieses Molekül in die Membran des Endoplasmatischen Retikulums infizierter Zellen inseriert, dort mit den anderen Nichtstrukturproteinen des HCV kolokalisiert und so eine Komponente des membranassoziierten zytoplasmatischen HCV-Replikationskomplexes darstellt (Hugle et al. 2001). Allerdings ist auch die genaue Funktion des HCV NS4B unklar.

NS5 als letztes der Nichtstrukturproteine wird in das stabile NS5A und das kurzlebige NS5B gespalten. Die Funktion des NS5A, eines Phosphoproteins, ist noch nicht geklärt. Es interagiert mit der  $\alpha$ -Untereinheit des multifunktionalen bovinen Translations-Elongations-Faktors 1A und könnte diesen so für die virale Replikationsmaschinerie nutzbar machen (Johnson et al. 2001).

Bei dem als NS5B bezeichneten Protein handelt es sich um die virale RNA-Polymerase. Es enthält das charakteristische Motiv (Aminosäureabfolge G-D-D) und besitzt die Fähigkeit, an RNA gebundene Primer zu verlängern (Kamer and Argos 1984; Meyers, Rumenapf, and Thiel 1989a; Poch et al. 1989; Zhong, Gutshall, and Del Vecchio 1998; Xiao et al. 2002; Xiao et al. 2003).

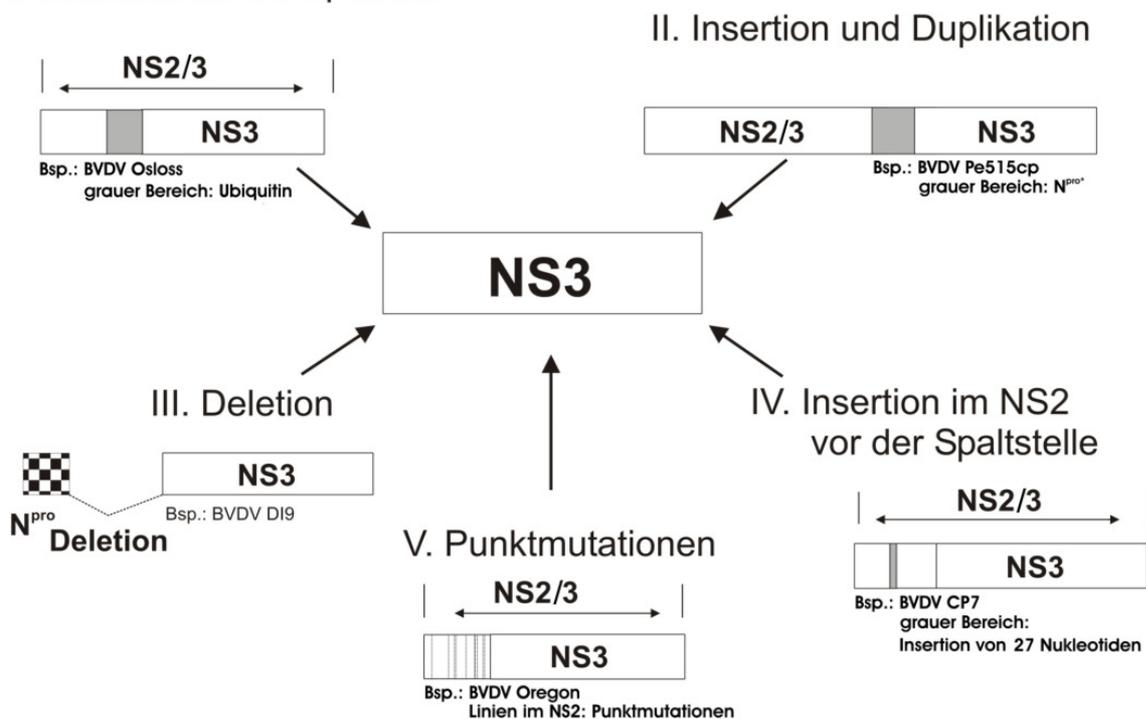
Im RNA-Genom folgt auf den Sequenzabschnitt, der für das NS5B kodiert, der 3'-nichtkodierende Bereich. Dieser scheint bei der Initiation der Replikation von Bedeutung zu sein. Im Segment des 3'-NTR finden sich zwei Sekundärstrukturen, sogenannte „*stem loops*“, die bei Pestivirus-RNAs sehr konserviert sind. Diese Strukturen sind als „cis agierendes“ Signal für die Virusreplikation von Bedeutung und stellen vermutlich einen Teil des Negativ-Strang-Promotors dar (Yu, Grassmann, and Behrens 1999; Grassmann et al. 2001).

Im Jahre 1946 wurde das BVD-Virus erstmals als Auslöser der milde verlaufenden bovinen Virusdiarrhöe beschrieben (Olafson, MacCallum, and Fox 1946). Reihenuntersuchungen im Feld zeigten, dass heute 60 - 90% aller Rinder Antikörper gegen BVD-Viren aufweisen (Liess et al. 1974; Steck et al. 1980). Der Nachweis, dass das BVD-Virus ebenfalls das auslösende Agens der seit dem Jahre 1953 bekannten „mucosal disease“ (MD) des Rindes ist, gelang 1961 (Gillespie et al. 1961). Diese Krankheit, die meist im Alter von sechs Monaten bis zwei Jahren auftritt, äußert sich in hohem Fieber und Läsionen an den Schleimhäuten von Maul, Rachen und Darm. Durch die Schädigungen der Darmschleimhaut kommt es zum Einbluten ins Darmlumen und einem Funktionsverlust der Schleimhaut. In Folge der mangelhaften Wasserresorption sterben die Tiere letztendlich innerhalb von etwa zwei Wochen an Dehydratation (Ramsey and Chivers 1953; Moennig and Plagemann 1992). Voraussetzung für diese schwerste Form der BVDV induzierten Erkrankung ist die Infektion eines trächtigen Rindes mit einem nzp Stamm im ersten Drittel der Trächtigkeit (Liess et al. 1984). Föten dieser Kühe werden über die Plazenta infiziert und entwickeln eine spezifische Immuntoleranz gegenüber dem infizierenden Virus, welche lebenslange Persistenz des Erregers zur Folge hat. Bei solchen persistent infizierten Tieren kann es spontan zum Ausbruch der MD kommen.

Tiere, die an MD erkranken, weisen eine Besonderheit auf. Neben dem persistierenden nzp Virus lässt sich stets auch ein zp Virus isolieren (McKercher et al. 1968; McClurkin, Bolin, and Coria 1985; Wilhelmssen et al. 1991). Beide aus einem Tier isolierten Biotypen werden als Viruspaar bezeichnet und weisen eine extrem hohe antigene Verwandtschaft auf. Dies führte zu der Hypothese, dass die antigene Ähnlichkeit der Viren Voraussetzung für die MD-Entwicklung ist. (Pocock et al. 1987; Howard, Brownlie, and Clarke 1987; Corapi, Donis, and Dubovi 1988). Diese Vermutung wurde experimentell bestätigt, indem persistent infizierte Tiere mit einem serologisch ähnlichen zp BVDV-Stamm überinfiziert wurden und in der Folge das Krankheitsbild der MD entwickelten. Im Gegensatz dazu wurde nach Überinfektion mit antigenisch fremden BVD-Viren in der Regel keine MD ausgelöst (Brownlie, Clarke, and Howard 1984; Bolin et al. 1985; Moennig et al. 1990).

Die nahe antigene Verwandtschaft der Viren eines Viruspaars führte zu der Vermutung, dass im natürlichen System das zp BVDV im persistent infizierten Tier durch Mutation aus dem nzp Virus hervorgeht. Diese Hypothese wurde durch Genomanalysen eines Viruspaars bewiesen (Meyers et al. 1991a). In nachfolgenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass zp BVD-Viren durch verschiedene Formen von RNA-Rekombination wie Insertionen, Duplikationen und Deletionen aus nzp BVD-Viren hervorgehen (Meyers et al. 1991a; Meyers et al. 1991b; Meyers et al. 1992; Qi et al. 1992; Tautz et al. 1994; Tautz et al. 1996; Kupfermann et al. 1996) (Abb.2).

### I. Insertion an der Spaltstelle



**Abb. 2: Schematische Darstellung der Genomorganisation verschiedener zp BVD-Viren im NS2/3 kodierenden Bereich.**

Die Genomveränderungen von zp BVD-Viren umfassen Mutationen, Insertionen, Duplikationen und Deletionen. Das Genom des zp BVDV-Stammes Osloss beinhaltet in dem für NS2/3 kodierenden Genombereich eine für Ubiquitin (Ub) kodierende Sequenz. Im Genom des zp BVDV-Stammes Pe515CP wurde eine Duplikation nachgewiesen, die u. a. für ein N-terminal verkürztes N<sup>pro</sup> (N<sup>pro\*</sup>) und das NS3-Protein kodiert. Im NS2-Gen des zp Stammes CP7 konnte eine Insertion von 27 Nucleotiden identifiziert werden, die einen Sequenzabschnitt aus dem N-terminalen Bereich des NS2-Gens wiederholt, welcher nicht im ursprünglichen Leseraster inseriert ist und somit für eine im viralen Polyprotein nicht vorhandene Peptidsequenz kodiert. Das zp-Isolat des Viruspaars nzp/zp 9 enthält ein defektes interferierendes Partikel (DI), dessen Genom eine Deletion aufweist, die die gesamten Strukturproteingene sowie die für p7 und NS2 kodierenden Gene umfasst. Im Genom des Stammes Oregon findet sich keine durch Rekombination verursachte Veränderung, aber ein Set von Punktmutationen, die zu der unregulierten Freisetzung des NS3 führen.

Neben Duplikationen viraler Sequenzen wurden auch Insertionen zellulären Ursprungs in zp BVDV-Genomen identifiziert. So ist im Genom des BVDV-Stammes Osloss eine für Ubiquitin kodierende Sequenz eingefügt (Meyers, Rümenapf, and Thiel 1989). Der zp Stamm NADL enthält die 90 Kodons umfassende genetische Information für eine als cIns bezeichnete zelluläre Insertion, die im NS2-Genabschnitt eingebaut ist. Das eingefügte Fragment kodiert für das Protein „Jiv“ („J-domain protein interacting with viral protein“), das einen regulatorischen Einfluss auf die Expression des NS3 hat (Meyers et al. 1991b; Rinck et al. 2001). Das Genom des zp BVDV-Stammes Pe515CP enthält keine zelluläre Insertion aber duplizierte virale Sequenzen, die für eine N-terminal verkürzte Autoprotease N<sup>pro</sup> (N<sup>pro\*</sup>), das NS3-Protein sowie einen Teil des NS4A-Proteins kodieren (Meyers et al. 1992). Im Falle des BVDV-Paares zp/nzp 7 ist im NS2-Gen des zp Stammes eine Insertion von 27 Nukleotiden identifiziert worden, die einen Sequenzabschnitt aus dem N-terminalen Bereich des NS2-Gens wiederholt, welche nicht im ursprünglichen Leseraster inseriert ist und somit für eine im viralen Polyprotein nicht vorhandene Peptidsequenz kodiert (Tautz et al. 1996). Alle beschriebenen Rekombinationen enthalten zusätzliche Sequenzen in ihrem Genom. Zytopathogene BVDV können aber auch durch Deletion von Sequenzen entstehen. Dies führt zum Auftreten eines defekten interferierenden Partikels (DI). Bei RNA-Analysen von Zellen, die mit den zp Viren solcher Paare infiziert waren, konnte zusätzlich zu der genomischen RNA mit einer Länge von 12,3 kb eine weitere BVDV-spezifische RNA von nur etwa 8,0 kb Länge nachgewiesen werden, die das Genom der DIs darstellt (Tautz et al. 1994; Kupfermann et al. 1996). Ein Beispiel ist das Viruspaar nzp9/DI9. Im Falle des DI9 fehlt der Bereich des viralen Genoms, der die Strukturproteine sowie das p7 und das NS2 kodiert. Als Konsequenz dieser Deletion folgt auf das Gen des N<sup>pro</sup> direkt der für NS3 kodierende Genomabschnitt (Tautz et al. 1994).

Der BVDV Stamm Oregon, der auf ein im Jahre 1960 beschriebenes zp BVDV-Isolat zurückzuführen ist, zeigt weder Insertionen noch Deletionen oder Duplikationen im Bereich des NS2/3-Proteins auf, sondern das NS2-Gen selbst ist an einer Reihe von Positionen durch Punktmutationen verändert (Kümmerer, Stoll, and Meyers 1998). Der Stamm Oregon stellt jedoch keinen Einzelfall dar, auch die Stämme Singer, Lamspringe und Danmark sind BVD-Viren, deren

Genome durch Rekombinationen hervorgerufene Veränderungen enthalten, so dass nahe liegt, dass auch in diesen Fällen Punktmutationen im NS2-Genabschnitt vorliegen (De Moerlooze et al. 1990; Pellerin et al. 1995). Die Genommodifikationen, die für den zp Phänotyp der verschiedenen zp BVDV-Stämme verantwortlich sind, führen auf Proteinebene alle zu einer dauerhaften Expression des NS3-Proteins. Das ungespaltene Protein NS2/3 hingegen kann sowohl in mit zp - als auch mit nzp Viren infizierten Zellen immer detektiert werden (Donis and Dubovi 1987; Pocock et al. 1987; Collett et al. 1988b; Meyers et al. 1991a; Meyers et al. 1992).

Der Mechanismus der für den zp Typ charakteristischen dauerhaften Expression des Proteins NS3 konnte in einigen Fällen mit den genetischen Modifikationen der BVD-Viren in Verbindung gebracht werden. In Folge des Rekombinationsprozesses geht im Polyprotein des BVD-Stammes Osloss dem NS3 das inserierte Ubiquitin-Monomer voraus (Abb.2). Zelluläre Proteasen, die „Ubiquitin-C-terminal-hydrolases“ (UCHs), spalten direkt nach dem Ubiquitin-Monomer, so dass es zur Freisetzung des NS3-Proteins kommt (Tautz, Meyers, and Thiel 1993).

Der Stamm Pe515CP weist eine für ein N-terminal verkürztes N<sup>pro\*</sup> kodierende Duplikation auf, auf welche direkt das NS3-Gen folgt (Abb.2). Im Polyprotein ist somit der Aminoterminus des NS3 mit dem Carboxyterminus des N<sup>pro\*</sup> fusioniert. Durch die autokatalytische Aktivität des N<sup>pro\*</sup> wird das Fusionsprotein gespalten und der N-Terminus des NS3 generiert (Meyers et al. 1992).

Analog verläuft die Freisetzung des NS3 beim DI9. Die Autoprotease N<sup>pro</sup> geht dem NS3 im Polyprotein aufgrund der beschriebenen Deletion unmittelbar voraus (Abb.2). Die Freisetzung des NS3 gelingt durch die autokatalytische Abspaltung des N<sup>pro</sup> vom übrigen Protein (Tautz et al. 1994). Die Trennung des NS2/3 Proteins der BVD-Viren CP7 und Oregon ist noch nicht abschließend geklärt, da die für eine unkontrollierte Spaltung beteiligte(n) Protease(n) noch nicht identifiziert wurde(n). Bisher konnte eine Protease im NS2 charakterisiert werden, die für die gesteuerte Prozessierung des NS3 in der frühen Phase der Infektion verantwortlich ist (Lackner et al. 2004). Vermutlich haben die spezifischen Genomveränderungen dieser beiden zp BVDV zur Folge, dass die Regulation der Prozessierung gestört wird.

Eine der in Europa und vielen anderen Regionen der Welt ökonomisch bedeutendsten Tierseuchen ist die klassische Schweinepest (europäische Schweinepest), im englischen Sprachraum auch als "classical swine fever" (CSF) oder "hog cholera" bezeichnet. Es handelt sich hierbei um eine virale Erkrankung, die unter natürlichen Bedingungen nur beim Haus- und Wildschwein auftritt. Der Erreger ist das "classical swine fever virus" (CSFV). Die Krankheit wurde erstmals 1833 im US-Bundesstaat Ohio beobachtet. Die Virusätiologie wurde 1904 von DeSchweinitz und Dorset beschrieben (DeSchweinitz and Dorset 1904). Heute tritt die Krankheit in den Ländern Europas, Zentral- und Südamerikas, Asiens und Afrikas auf.

Unter natürlichen Bedingungen erfolgt die Infektion der Schweine mit CSFV oronasal. Die primäre Vermehrung findet in lymphatischen Organen statt (Dunne, Hokanson, and Luedke 1959). Nach der Virämie werden weitere lymphatische Gewebe und das Knochenmark infiziert, in denen es zur sekundären Virusvermehrung kommt. Charakteristische Zielzellen der Virusinfektion sind lymphoretikuläre Zellen, Endothelzellen und Makrophagen (Ressang 1973).

Das Schweinepest-Virus kann in Abhängigkeit von Tragezeit, Alter des Schweins und Virulenz des Erregers die Plazenta passieren und so den Fötus infizieren (Frey et al. 1980). Die infizierten und nicht im Mutterleib verendeten Ferkel überleben die Geburt häufig nur wenige Wochen (van Oirschot and Terpstra 1977; Meyer et al. 1981).

Mehrere Stämme des CSF-Virus, die Krankheitsbilder unterschiedlichen Schweregrades auslösen, sind identifiziert worden. Neben klinisch inapparenten Formen werden auch perakute, akute, subakute und chronische Verläufe beobachtet. Es erfolgt eine Einteilung in hochvirulente (z.B. Stamm Brescia), mäßig-virulente (z.B. Stamm Alfort/Tübingen), schwachvirulente (z.B. Stamm Glentorf) und avirulente Stämme (z.B. C-Stamm) (van Oirschot and Terpstra 1977).

Für die Inkubationszeit und den Erkrankungsgrad sind neben dem beteiligten Virusstamm auch die Virusdosis und verschiedene Wirtsfaktoren wie Alter, Konstitution, Kondition und Immunkompetenz des Tieres verantwortlich (van Oirschot 1988). Avirulente Stämme treten ausschließlich unter Laborbedingungen auf und werden als Impfstoffe eingesetzt.

Ähnlich wie bei BVD-Viren konnten auch bei Viren der klassischen Schweinepest zytopathogene Stämme beobachtet werden. Die hier zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind ebenfalls auf RNA-Rekombinationen zurückzuführen und beruhen ausschließlich auf Deletionen. Die zp Isolate AlfortM, cpBW1, VA187-1 und cpMP1 beispielsweise enthalten defekte interferierende Partikel, deren Genome jeweils eine Deletion aufweisen, die die gesamten Strukturproteingene sowie die für N<sup>pro</sup>, p7 und NS2 kodierenden Gene umfasst (Meyers and Thiel 1995; Mittelholzer et al. 1997; Kosmidou, Büttner, and Meyers 1998).

Der bedeutendste molekulare Unterschied zwischen BVDV und CSFV liegt in der Expression des NS3. Dieses Protein wird bei den Viren der klassischen Schweinepest konstitutiv exprimiert, ist jedoch nicht mit dem Auftreten des zp Biotyps korreliert. Das vermehrte Vorkommen des NS3 in zp-CSFV infizierten Zellen führte zu der Hypothese, dass die erhöhte Konzentration an NS3 in den infizierten Zellen verantwortlich sein könnte für die Ausbildung eines ZPE und somit das Auftreten eines zp CSFV.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Spaltstelle der Nichtstrukturproteine NS2 und NS3 des BVD-Stammes Oregon und des CSF-Virus Alfort näher untersucht und der Einfluss von Mutationen auf die Prozessierung des Polyproteins und die Lebensfähigkeit der Viren analysiert werden. Weiterhin wurden NS3 exprimierende nzp BVDV durch Mutation des NS4B erzeugt und analysiert.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

ABI-PRISM 377 DNA Sequencer und Zubehör	Applied Biosystems, Weiterstadt
Begasungsbrutschrank 3166	Forma Sci., Marietta, Ohio, USA
Biotrap BT 1000	Schleicher & Schuell, Dassel
Branson Ultraschallgerät Sonifier B-30, B-15	Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Brutschränke mit CO <sub>2</sub> -Begasung: B 50 61 EK/CO <sub>2</sub>	Heraeus, Osterode
Tiefkühltruhe Colora UF 75 450 S (-70 °C)	Colora, Mühlheim
Diavert-Invertmikroskop	Leitz, Wetzlar
Eismaschine AF 10	Scotsman Ice Systems Vernon Hills, IL, USA
Filmkassetten	Agfa, Köln
Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axioskop	Zeiss, Oberkochen
Gefriertrocknungsanlage ALPHA I/6	Martin Christ, Osterode
Gelelektrophoresekammern, horizontal	BRL, BFAV-Eigenbau
Gelelektrophoresekammern, vertikal	Hoefer, BFAV-Eigenbau
Geltrockner SE 1150	Amersham Bioscience, Freiburg
Gene Amp PCR-System 9600	Perkin Elmer, Überlingen
Gießvorrichtung für Proteingele (SE 6015)	Amersham Bioscience Freiburg
Glasgeräte	Schott, Mainz
Herolab E.A.S.Y. Geldokumentationssystem	Herolab, Wiesloch
Hybridisierungsschrank HY 400	Bachofer, Reutlingen
Inkubationsschüttler G-25	New Brunswick, Edison, NJ, USA
15-Taschen-Kamm (SE 511-15-1,5)	Amersham Bioscience Freiburg

Kühlschrank Liebherr KT1920	Liebherr, Ochsenhausen
Kühlwasserbad	Haake, Karlsruhe
Laminar-flow-Reinraumarbeitsplatz, LFR 80 VU	Prettl, Pfullingen
Liquid Scintillation Analyser, Trio Carb 2100 TR	Packard, Groningen, Niederlande
LKB 2219 MultiTempII Thermostatic Circulator	LKB, München
LKB 2301 Macrodrive 1 Power Supply	LKB, München
Magnetrührer, beheizbar: IKAMAG RCT	IKA Labortechnik, Staufen im Breisgau
Mettler J-Serie Waagen	Mettler-Toledo, Gießen
Microcomputer Electrophoresis Power Supply 250 / 1000	Renner, Dannstadt
Mikroprozessor-pH-Meter 743, Knick	Bachofer, Reutlingen
Mikrowellengerät HMG 760/62.B	Bosch, Gerlingen
Phosphoimager Fujifilm BAS 1500	Fujifilm, Düsseldorf
Photoapparatur MP4 Hand Kamera	Polaroid, Cambridge, MA, USA
Pipetten	Eppendorf, Hamburg Gilson, Villiers-le Bel, Frankreich
Radioaktivitätsmeßgerät Mini Assay Typ 6-20	Mini Instruments Bebig, Berlin
Red Rotor Model PR70	Amersham Bioscience, Freiburg
Röntgenfilmentwicklungsmaschine QX 130	Konica, Hohenbrunn
Sartorius Analytic A 200 S (Feinwaage)	Sartorius, Göttingen
Semi-Phor TE70 (Semi-dry transfer unit)	Amersham Bioscience, Freiburg
Speed Vac Concentrator (Savant)	Bachofer, Reutlingen
Spektrophotometer DU-64	Beckman, München
Sterilbank Lamin Air HLP 2472 GS / HB 2472	Heraeus, Osterode
Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Tiefkühlschrank Liebherr (-20 °C)	Liebherr, Ochsenhausen
Transilluminator (254 nm)	Bachofer, Reutlingen

---

Transilluminator (302 nm)	R. Vetter, Ammerbuch
Trio-Thermoblock (für PCR)	Biometra, Göttingen
Ultraspec 3000 (UV/VIS-Spektrophotometer)	Amersham Bioscience, Freiburg
UV-Leuchte	Bachofer, Reutlingen
UV Stratalinker 1800	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Vakuumtrockenofen	Heraeus, Osterode
Vortex Vibrofix VF1 (IKA)	Bachofer, Reutlingen
Wasserbad Julabo U3/ F20/ SW20C	Bachofer, Reutlingen

#### Zentrifugen:

Kühltischzentrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge J2-21	Beckman, München
Laborzentrifuge: Minifuge GL, Varifuge RF	Heraeus, Osterode
Tischultrazentrifuge TL-100	Beckman, München
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifugen: TGA 65, Centrikon T-2070	Kontron Instruments, München

#### Rotoren:

JA10, JA17, JS13.1,	Beckman, München
SW41Ti, TLA 45	Beckman, München
TST 54	Kontron Instruments, München

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterial

Einmalspritzen	Braun, Melsungen
Filterpapier 3MM	Whatman, Maidstone, GB
Gewebekultur-Kunststoff-Einmalartikel	Greiner, Frickenhausen
Glasfaserfilter GF/C	Whatman, Maidstone, GB
Kanülen, Plastikspritzen	Terumo, Leuven, Belgien
(Halb-)Mikroreaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Nitrozellulose BA 83 (Ref.-# 401396, 0,2 µm)	Schleicher & Schuell, Dassel

Nylonmembranen (Duralon)	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Nukleinsäure Transfer Membran Hybond N <sup>+</sup>	Amersham Bioscience, Freiburg
Pipettenspitzen	Greiner, Frickenhausen
Polaroid-Filme Typ 665, 667	Polaroid, Cambridge, MA, USA
Röntgenfilme BioMax MR	Kodak, Rochester, NY, USA
Zentrifugenröhrchen, Polyallomer-Röhrchen	Beckman, München
<b>2.1.3 Reagenzien</b>	
0.24-9.50 Kb RNA Ladder	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
1 Kb Plus DNA Ladder	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
1,2-Bis-(2-Aminoethoxyethan)- Tetraessigsäure	Sigma, Deisenhofen
Acridinorange (research grade)	Serva, Heidelberg
Acrylamid-Stammlösungen	AppliChem, Darmstadt
Agarose für die Gelelektrophorese	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Aminoethylcarbazol	Fluka, Taufkirchen
Aminosäuren	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Serva, Heidelberg
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Serva, Heidelberg
Bacto-Agar	Difco Lab., Detroit, MI, USA
Bacto-Hefeextrakt	Difco Lab., Detroit, MI, USA
Bacto-Trypton	Difco Lab., Detroit, MI, USA
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, München

---

BlueDextran/ EDTA	Perkin Elmer, Überlingen
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA (Rinderserumalbumin; Fraktion V)	Sigma, Deisenhofen
Cäsiumchlorid	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brillant Blue G250	Serva, Heidelberg
Creatinphosphat	Sigma, Deisenhofen
Desoxynukleosidtriphosphate	Amersham Bioscience, Freiburg
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma, Deisenhofen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
di-Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
DTT (Dithiothreitol)	Roche, Basel, Schweiz
Ethylendiaminetetraacetat-dinatriumsalz	Serva, Heidelberg
Erythrosin B	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure	Hoechst, Dortmund
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
FCS (fötales Kälberserum)	PAA, Seromed
Formalin	Merck, Darmstadt
Formamid	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Fructose-1,6-bisphosphat	Sigma, Deisenhofen
Glukose	Merck, Darmstadt
Glycerin (87%)	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glyoxal (40%)	Fluka, Taufkirchen
Guanidiniumisothiocyanat	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Harnstoff	Merck, Darmstadt

Hefeextrakt	Difco Lab., Detroit, MI, USA
HEPES (2-[4-(2-Hydroxyl-ethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure)	Fluka, Taufkirchen
Hydroxychinolin	Merck, Darmstadt
Isopropylthiogalaktosid	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	Riedel-de Haën, Seelze
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogen-Phosphat	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma, Deisenhofen
Kristallviolett	Merck, Darmstadt
Lauryl-Sarcosinat (N-Lauryl-Sarcosin)	Sigma, Deisenhofen
LipofectAMINE Reagent	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Lipofectin Reagent	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Lithiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat-Trihydrat	Roth, Karlsruhe
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdesoxycholat (95%)	Sigma, Deisenhofen
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natronlauge	Merck, Darmstadt
N, N-Dimethylformamid	Fluka, Taufkirchen
N, N, N', N'-Tetramethyldiamin	Serva, Heidelberg
Nonidet P40	Roche, Basel, Schweiz
N-[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-glycin	ICN, Eschwege
Nukleosidtriphosphate	PeqLab, Erlangen
Orange G	Fluka, Taufkirchen
Penicillin G	Grünenthal, Stolberg

Phenol für DNA-Extraktion, Tris-gesättigt	AppliChem, Darmstadt
Phenol für RNA-Extraktion, H <sub>2</sub> O-gesättigt	AppliChem, Darmstadt
Phenolrot	Merck, Darmstadt
Phosphorsäure	Merck, Darmstadt
PIPES (Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfon-säure))	Merck, Darmstadt
Proteingrößenstandard, gefärbt, für PAGE	NEB, Frankfurt/M.
Salzsäure	Merck, Darmstadt
(SDS) Sodiumdodecylsulfat	Merck, Darmstadt
Sephadex G-50 und G-15 Säulenmaterial	Amersham Bioscience, Freiburg
Spermidin	Sigma, Deisenhofen
Streptomycin	Hefa Pharma, Werne
Sucrose (Saccharose)	Serva, Heidelberg
SuperFect Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
Tris (Trishydroxymethylaminomethan)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
tri-Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Trizol Reagenz	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
tRNA (aus Hefe)	Roche, Basel, Schweiz
Trypsin	Merck, Darmstadt
Tween-20	Sigma, Deisenhofen
Ultima Gold, Szintillationsflüssigkeit	Packard, Groningen, Niederlande
Vitamine	Sigma, Deisenhofen
Xylencyanol FF	Fluka, Taufkirchen

#### 2.1.4 Radiochemikalien

$\alpha$ [ <sup>32</sup> P] dCTP (3000 Ci/mmol, 1000 mCi/ml)	ICN, Eschwege
[ <sup>35</sup> S] Trans-Label (1175 Ci/mmol, 10,5 mCi/ml)	ICN, Eschwege
L-[ <sup>35</sup> S]-Cystein (1075 Ci/mmol, 10 mCi/ml)	ICN, Eschwege
L-[ <sup>35</sup> S]-Methionin (1175 Ci/mmol, 10 mCi/ml)	ICN, Eschwege
[ <sup>14</sup> C]- Protein-Molekulargewichtsstandard	Amersham Bioscience, Freiburg

### 2.1.5 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide für PCR und Sequenzierung wurden von Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) bezogen und vom Hersteller frei von Schutzgruppen, entsalzt und lyophilisiert geliefert. Sequenzen sowie Zuordnungen zu den jeweiligen Genomen/Plasmiden finden sich im Anhang aufgeführt.

### 2.1.6 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Roche, Basel, Schweiz
DNA Polymerase I, Klenow-Fragment	NEB, Frankfurt/M.
DNase I	Amersham Bioscience, Freiburg
Lysozym (chicken egg white, cryst. res. grade)	Serva, Heidelberg
Pfu DNA Polymerase	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Proteinase K	Roche, Basel, Schweiz
Restriktionsendonukleasen	NEB, Roche, AGS, BRL, Amersham Bioscience, MBI Fermentas
RNase A	Amersham Bioscience, Freiburg
RNasin (recombinant ribonuclease Inhibitor)	Promega, Madison, WI, USA
SuperScript II (RNase H <sup>-</sup> Reverse Transcriptase)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Taq-DNA-Polymerase	Appligene, Heidelberg
T4-DNA-Ligase	NEB, Frankfurt/M.
T4-DNA-Polymerase	NEB, Frankfurt/M.
T4-Polynukleotidkinase	NEB, Frankfurt/M.
T7-RNA-Polymerase	Amersham Bioscience, NEB

Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Reaktionen mit diesen Enzymen entsprechend der Hersteller-Protokolle mit den gelieferten Komponenten durchgeführt.

### 2.1.7 Kits

ABI™ PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt
cDNA-Synthese Kit	Amersham Bioscience, Freiburg
ECL (Western blot Detektion)	Amersham Bioscience, Freiburg
Jet Star Plasmid Purification System	Genomed, Bad Oeynhausen
Nick Translation Kit	Amersham Bioscience, Freiburg
Nucleobond AX Plasmid purification protocol	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin Extract	Macherey-Nagel, Düren
NucleoTrap Kit	Macherey-Nagel, Düren
QIAEX DNA Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce, Rockford, IL, USA

### 2.1.8 Antiseren und monoklonale Antikörper

#### 2.1.8.1 Antiseren

Die Antiseren Pep6 und A3 wurden von Dr. R. Stark (Universität Giessen) hergestellt.

- Antiserum Pep6: gerichtet gegen ein synthetisches Peptid (AS 1571-1586, BVDV CP7); hergestellt in Kaninchen (Tautz et al. 1996).
- Antiserum A3: gerichtet gegen ein bakterielles Fusionsprotein (AS 1750-2349, CSFV Alfort); hergestellt in Kaninchen (Thiel et al. 1991).



## 2.1.11 Zellen und Virusstämme

### 2.1.11.1 Zellen

- BHK-21 erhalten von T. Rümenapf (Universität Giessen)
- MDBK American Type Culture Collection
- SK-6 American Type Culture Collection
- KOP-R Zellbank der BFA-V, Riems

### 2.1.11.2 Virusstämme

- Bovines virales Diarrhöe Virus (BVDV), Stamm Oregon: erhalten von Prof. Dr. B. Liess, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- BVDV, Stämme NCP7 und CP7 : erhalten von Dr. E. J. Dubovi, Cornell University, New York, USA, (Donis, Corapi, and Dubovi 1988)
- BVDV, Stamm Osloss: erhalten von Prof. Dr. B. Liess, Tierärztliche Hochschule Hannover (Renard et al. 1987)
- BVDV, Stamm NADL: erhalten von Dr. M. S. Collett, Molecular Vaccines Inc. Maryland, USA (Collett et al. 1988a).
- Rekombinantes Vacciniavirus, Stamm Ankara, modifiziert, T7-Polymerase exprimierend (MVA-T7): erhalten von Dr. B. Moss, National Institutes of Health, Maryland, USA. (Wyatt, Moss, and Rozenblatt 1995)

### 2.1.12 Zellkulturmedien

BFA-35 (Trypsinlösung):

8,00 g/l	NaCl
0,20 g/l	KCl
1,44 g/l	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
0,20 g/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
2,50 g/l	Trypsin 1:300
1,23 g/l	EDTA Na <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
0,016 g/l	Phenolrot

BFA-34T: Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium mit folgenden Zusätzen:

Aminosäuren:	0,0178 g/l	L-Alanin
	0,0300 g/l	L-Asparaginsäure
	0,0700 g/l	Glycin
	0,0750 g/l	L-Glutaminsäure
	0,0250 g/l	L-Prolin
Vitamine:	0,1000 mg/l	Biotin
	0,0250 g/l	Hypoxanthin
	3,7000 g/l	NaHCO <sub>3</sub>

Vor Gebrauch Zugabe von 10% fötalem Kälberserum (FCS), 0,04 g/l Penicillin und 0,07 g/l Streptomycin.

DMEM, -Cys, -Met

Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

### 2.1.13 Stammlösungen und Medien

Acridinorange-Stammlösung:

10 mg/ml in 1 x PBS

Acridinorange-Arbeitslösung:

Stammlösung 1 : 300 in  
1x Phosphatpuffer

Ampicillin-Lösung (1.000x):

100 mg/ml in A. dest.  
sterilfiltrieren,  
Lagerung bei -20 °C

APS-Lösung:

10 % (w/v) APS in A. dest.  
aliquotieren,  
Lagerung bei -20 °C

CaCl<sub>2</sub>-Lösung:

60 mM CaCl<sub>2</sub>  
15 % Glycerin

10 mM PIPES, pH 7,1

Coomassie-Lösung:

0,1 % Coomassie  
Brilliant blue in  
Fixier-Lösung

DEPC-Wasser:

0,1 % DEPC in Aqua bidest  
über Nacht bei RT rühren  
(Abzug!) und durch  
Autoklavieren inaktivieren

Ethidiumbromid-Lösung: 10 mg/ml in 1x TAE-Puffer	Lämmli-Elektroden-Puffer (10x): 1,92 M Glycin 0,25 M Tris 0,10 % SDS pH 8,3 vor SDS-Zugabe mit HCl einstellen
Fixier-Lösung für PAGE: 30 % Methanol 10 % Essigsäure in A. dest.	
Glyoxal: 8,8 M Glyoxal (40% in A. dest.) mit SERDOLIT MB-1 entionisieren	Ligase-Puffer (10x): 500 mM Tris-HCl, pH 7,8 100 mM MgCl <sub>2</sub> 100 mM DTT 10 mM ATP 250 µg/ml BSA
HeBSS: 5 g HEPES 8 g NaCl 370 mg KCl 125 mg Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 1 g Glukose ad 1l A.dest., pH 7,05	Luria Bertrani (LB)-Agar: LB-Medium + 1,5 % (w/v) Agar-Agar
Kristallviolett-Lösung: 1 % Kristallviolett 50 % Ethanol in A. dest.	Luria Bertrani (LB)-Medium: 1,0 % Bacto-Trypton 0,5 % NaCl (w/v) 0,5 % Hefeextrakt (w/ v) pH 7,3 mit Natronlauge
10 x Klenow-Puffer: 100 mM Tris-HCl, pH 8,5 50 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM DTT	LB <sup>++</sup> -Medium: 10 mM KCl 20 mM MgSO <sub>4</sub> in LB-Medium

PBS:

137,0 mM NaCl  
2,7 mM KCl  
6,7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
0,7 mM CaCl x 2 H<sub>2</sub>O  
0,5 mM MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O

Phenol:

mit TE gesättigte  
Phenollösung mit  
0,1 % Hydroxychinolin

Phosphatpuffer (50x):

250 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
250 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O  
pH mit NaOH auf  
6,8-7,0 einstellen

Polynukleotidkinase-Puffer (10x):

700 mM Tris-HCl, pH 7,6  
100 mM MgCl<sub>2</sub>  
50 mM DTT

Probenpuffer für

DNA-Agarose-Gele (10x):

20,0 mM EDTA, pH 8,0  
50,0 % Glycerol  
0,2 % Orange G  
0,2 % Xylencyanol FF  
0,1 % Bromphenolblau

Probenpuffer für DNA-Sequenzgele:

80 % Formamid  
20 % BlueDextran/ EDTA

Probenpuffer für PAGE, (1 x) :

6,00 M Harnstoff  
62,50 mM Tris-HCl, pH 6,8  
5,00 % β-Mercaptoethanol  
10,00 % Glycerin  
2,00 % SDS  
0,01 % Bromphenolblau  
0,01 % Phenolrot

Probenpuffer für

RNA-Agarose-Gele:

0,25 % Bromphenolblau  
0,25 % Xylencyanol FF  
0,10 % Orange G  
30,00 % Glycerin

in autoklaviertem A. dest. lösen

RNaseA-Lösung:

10 mg/ml RNase A in 1 x TE  
nach mehrmaligem Erhitzen  
und Abkühlen aliquotieren

SSC (20x):

3,0 M NaCl  
0,3 M Na<sub>3</sub>Citrat x 2 H<sub>2</sub>O  
mit NaOH auf pH 7,0  
einstellen

TAE-Puffer (50x) :	Translations-Reaktionsgemisch, (12,5 x; Roche):
2 M Tris	je 312,5 µM Aminosäuren (ohne Met)
250 mM Natriumacetat	37,5 mM Fructose-1,6- bisphosphat
50 mM EDTA	30,0 mM cAMP
pH 7,8 mit Essigsäure einstellen	12,5 mM dATP
TBE-Puffer (10x):	2,5 mM dGTP
500 mM Tris-HCl, pH 8,3	100,0 mM Creatinphosphat
500 mM Borsäure	250,0 mM Hepes, pH 7,6
20 mM EDTA	
TE-Puffer (10x):	Transkriptionspuffer (5x)
100 mM Tris-HCl, pH 7,5	300 mM Tris-HCl, pH 7,5
10 mM EDTA	30 mM MgCl <sub>2</sub>
	50 mM NaCl
TENS-Lösung:	10 mM Spermidin
0,1 N NaOH	
0,5 % SDS	
in 1x TE	

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Gewebekultur**

MDBK-, SK6- und BHK21-Zellen wurden in BFA-34T-Medium mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) bei 37 °C und 7 % CO<sub>2</sub> in feuchter Atmosphäre kultiviert. Die auf dem Boden der Gewebekulturschale anhaftenden Zellen wurden alle 3-4 Tage (bei Erreichen eines konfluenten Zellrasens) durch Trypsinbehandlung abgelöst und in geeigneten Verdünnungen (MDBK 1:5, SK6 1:6, BHK-21 1:8) in neue Gewebekulturschalen eingesät und weiter passagiert.

#### **2.2.1.1 Infektion von MDBK- und SK6-Zellen**

MDBK- bzw. SK6-Zellen wurden in der Regel am Vortag der Infektion so eingesät, dass zum Zeitpunkt der Infektion der Zellrasen eine Dichte von ca. 80% aufwies. Die Infektion der Zellen erfolgte bei 37 °C in etwa 20% des normalen Kulturvolumens mit einer m.o.i. von 0,01-1 in BFA-34T. Nach einstündiger Inkubation wurde der Überstand abgenommen, neues Medium mit FCS zugegeben und der Ansatz 6 bis 72 h im Inkubator bebrütet. Die mit zytopathogenen Viren infizierten Zellen wurden nach Auftreten des ZPE (ca. 50% Lyse) geerntet, die mit nicht nzp Viren infizierten Zellen nach 72 h. Durch dreimaliges Frieren und Tauen wurden die Zellen in der Suspension vollständig lysiert, um die Freisetzung der Viren zu gewährleisten. Diese Zellsuspensionen wurden anschließend aliquotiert und bei -70 °C gelagert.

#### **2.2.1.2 Bestimmung der Zahl lebender Zellen**

Zur Bestimmung der Zahl lebender Zellen wurden diese mit Trypsin 5-10 min im Brutschrank inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen vom Boden der Gewebekulturschale erfolgte die Resuspension der Zellen mit einer 1 ml Glaspipette bis einzelne Zellen vorlagen. Durch Zugabe des doppelten Volumens an FCS-haltigem Medium wurde die Trypsinbehandlung gestoppt. Zur Bestimmung der Zahl lebender Zellen wurde die Zellsuspension 1:10 in Erythrosin B (1 mg/ml in PBS) verdünnt. Im Gegensatz zu lebenden Zellen nehmen tote Zellen das Erythrosin B auf und färben sich dadurch rötlich. In einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer wurden die sich in vier diagonalen Quadranten befindenden nicht angefärbten Zellen unter dem Mikroskop

ausgezählt. Die Berechnung der Zellzahl (in Zellen/ml) erfolgte mittels folgender Formel:

gezählte Zellen x 4 x Verdünnungsfaktor x 0,35 x 10<sup>3</sup>.

### 2.2.1.3 Titration und Titerberechnung

Die Endpunkttitrationsen von Viren erfolgten in 96-well-Platten. Je Titrationsreihe wurde mit 100 µl des Virusstocks begonnen. Die Virusverdünnung wurde in 5 ml-Glasröhrchen in Doppelbestimmungen durchgeführt und erfolgte in Verdünnungsstufen von 1:10. Jeweils 100 µl Virusverdünnung wurden in vier entsprechende Kavernen einer 96-well-Platte überführt. Anschließend wurden 1,75 x 10<sup>4</sup> MDBK- oder SK6-Zellen (BVDV bzw. CSFV) in 100 µl FCS-haltigem Medium den Titrationsreihen zugegeben und der Ansatz für drei bis fünf Tage im Brutschrank inkubiert. Die Auswertung der Titration erfolgte bei zp Viren über die Identifikation des ZPE in der entsprechenden Kammer. Der Fortschritt des ZPE wurde täglich verfolgt. Der Titer, bezogen auf einen Milliliter, wurde rechnerisch nach Spearman und Kärber wie folgt ermittelt:

Negativer Log. des 50%-Endpunktes = Negativer Log. der höchsten verwendeten Viruskonzentration - [ (((Summe der % der inf. Kulturen jeder Verdünnung / 100) - 0.5) x Log. der Verdünnung) ]

Da die Infektion bei der Messung mit 100 µl Verdünnung erfolgte, musste für die Umrechnung auf ml noch der Wert 1 von dem Ergebnis subtrahiert werden. Wenn durch die Messung ein Wert von 10<sup>-4,75</sup> ermittelt wurde, bedeutete dies, dass 1 ml des Überstandes in einer Verdünnung von 10<sup>-4,75</sup> alle Zellen einer Kultur mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% infizierte. Der Titer dieses Überstandes wurde dann mit TCID<sub>50</sub> von 10<sup>4,75</sup> angegeben. Dabei wurde für jeden Virusstock der Mittelwert aus beiden Titrationsreihen ermittelt.

Die Auswertung der Titration von nzp Viren erfolgte mittels der indirekten Immunfluoreszenz.

#### **2.2.1.4 Indirekte Immunfluoreszenz**

Zum spezifischen Nachweis einer BVDV- bzw. CSFV-Infektion von Kulturzellen wurde die indirekte Immunfluoreszenz mit spezifischen monoklonalen Antikörpern durchgeführt. Dazu wurde das Gewebekulturmedium abgenommen und der Zellrasen dreimal mit PBS gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte mit Aceton/Methanol (1:1) für 15 min bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Danach wurden die Zellen im kalten Luftstrom getrocknet (in dieser Form bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  lagerbar). Nach Rehydrierung des Zellrasens mit 0,05% Tween-20 in PBS ( 2 min ) erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper [mAK (BVD-Mix bzw. anti-A18 für CSFV) 1:10 in PBS verdünnt] für mindestens 1 h bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 1 h bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit dem zweiten Antikörper (anti-Maus IgG-Antikörper, FITC-konjugiert; 1:100 in PBS) inkubiert. Die Zellen wurden erneut dreimal mit PBS gewaschen und im Fluoreszenzmikroskop beurteilt und der Titer anhand der gefärbten Zellen wie zuvor beschrieben berechnet.

#### **2.2.1.5 Transfektion von RNA in MDBK-Zellen**

Die Transfektion von MDBK-Zellen mit RNA erfolgte in Suspension nach der DEAE/Dextran-Methode. Die RNA (5  $\mu\text{g}$ ) wurde in 100  $\mu\text{l}$  HeBSS und 100  $\mu\text{l}$  DEAE-Dextran (1 mg/ml HeBSS) aufgenommen und für 30 min auf Eis inkubiert. Währenddessen wurden Zellen trypsinisiert und zentrifugiert (Minifuge GL, 1000 UpM, 10 min). Dabei wurden pro Transfektionsansatz  $3 \times 10^6$  Zellen eingesetzt. Die pelletierten Zellen wurden einmal mit BFA-34T ohne FCS gewaschen und anschließend in dem RNA-DEAE/Dextrangemisch resuspendiert. Der Gesamtansatz wurde 30 min im Brutschrank inkubiert. Dabei wurde das Röhrchen alle 10 min geschwenkt, um ein Verklumpen der Zellen zu vermeiden. Anschließend erfolgte die Zugabe von 20  $\mu\text{l}$  DMSO. Nach 2 min bei RT wurden 1,5 ml HeBSS zugegeben und die Zellen erneut zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in FCS-haltiges BFA-34T-Medium aufgenommen und in Gewebekulturschalen mit einem Durchmesser von 10 cm eingesät. Zur Regeneration der Zellen und Replikation der erzeugten Viren blieb der Transfektionsansatz für 3 Tage im Brutschrank.

### **2.2.1.6 Kristallviolettfärbung**

Zur Darstellung des ZPE erfolgte die Färbung von Zellen mit Kristallviolett. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und mit 5% Formalin für 30 min bei RT fixiert. Nach dem Abnehmen und Verwerfen der Formalin-Lösung erfolgte die Kristallviolettfärbung (1% Kristallviolett in 50% Ethanol) für 10 min. Die Kulturschalen wurden erneut gewaschen (Abwaschen der Färbelösung unter fließendem Leitungswasser) und bei Raumtemperatur getrocknet. Am Boden haftenden Zellen sind violett, während Plaques ungefärbt sind, da lysierte Zellen beim Fixieren und Waschen entfernt wurden.

### **2.2.1.7 Metabolische Markierung viraler Proteine**

Die Zellen einer Kulturschale mit einem Durchmesser von 3,5 cm wurden 24 h nach der Virusinfektion dreimal mit Markierungsmedium, welchem die Aminosäuren Methionin und Cystein fehlen, gewaschen. Die metabolische Markierung der Proteine erfolgte mit 125  $\mu\text{Ci}$  [ $^{35}\text{S}$ ] Methionin/[ $^{35}\text{S}$ ] Cystein ([ $^{35}\text{S}$ ] Trans-Label) in 500  $\mu\text{l}$  Markierungsmedium. Nach weiteren 24 h wurden das radioaktive Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Bis zur Extraktion der Antigene für die Radioimmunpräzipitation wurden die Zellen trocken bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### **2.2.2 Transiente Expression viraler Proteine im T7-Vacciniavirus-System**

Die Transfektion von Zellen mit den Plasmiden, die die zu exprimierenden Proteine kodierten, wurde mit dem „SuperFect Transfection Reagent“ durchgeführt. Am Vortag umgesetzte BHK-Zellen (3,5 cm Schale, 80% konfluent) wurden einmal mit BFA-34T Medium ohne FCS gewaschen und mit dem T7-Vacciniavirus (MVA-T7) mit einer m.o.i. von 5 infiziert. Während der einstündigen Inkubation bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit 7%  $\text{CO}_2$  wurden die DNA-Proben für die Transfektion vorbereitet. Hierzu wurden 4  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA in 75  $\mu\text{l}$  BFA-34T ohne FCS mit 10  $\mu\text{l}$  SuperFect-Reagenz vermischt und 5-10 min bei RT inkubiert. In dieser Zeit wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Danach wurden 600  $\mu\text{l}$  Medium mit FCS zum Transfektionsansatz zugegeben, gemischt und der Ansatz in die entsprechend markierte Gewebekulturschale gegeben.

### **2.2.2.1 Radioaktive *in vivo* Markierung transient transfizierter Zellen**

Nach 4 h wurden der Überstand des Transfektionsansatzes verworfen und die Zellen zweimal mit Markierungsmedium, welches kein Cystein und kein Methionin enthielt, gewaschen und für 1 h in diesem Medium bei 37 °C inkubiert. Nach erneutem Waschen mit Markierungsmedium erfolgte die Inkubation mit 125 µCi [<sup>35</sup>S] Methionin/[<sup>35</sup>S] Cystein ([<sup>35</sup>S] Trans-Label) in 0,5 ml Markierungsmedium für 4 bis 16 h. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und bis zur Aufbereitung der Zellextrakte bei -70 °C eingefroren.

### **2.2.3 Mikrobiologische Methoden**

#### **2.2.3.1 Anzucht von Bakterien**

Sämtliche Bakterienstämme wurden bei 37 °C unter Schütteln (175 UpM) in LB-Medium angezogen. Die Selektion plasmidhaltiger Bakterien erfolgte durch Zugabe des Antibiotikums Ampicillin (100 mg Ampicillin / l Medium).

#### **2.2.3.2 Dauerkulturen**

3 ml einer Übernachtskultur von Bakterien wurden abzentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge, 5 min, 3000 UpM), in 500 µl LB-Medium resuspendiert und mit 600 µl Glycerin (87%) vermischt. Die Bakterien-Suspension wurde mit Hilfe von flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert.

#### **2.2.3.3 Herstellung transformationskompetenter Bakterien**

Unter bakterieller Transformationskompetenz versteht man die Fähigkeit von Bakterienzellen, Fremd-DNA aufzunehmen. Hierfür ist es notwendig, dass die Zellwand der Bakterien für die DNA-Moleküle durchlässig gemacht wird. Dies kann durch Behandlung der Zellen mit Kalziumchlorid geschehen. Von einer entsprechenden Agarplatte mit dem gewünschten Bakterienstamm bzw. aus einer Dauerkultur wurde eine Vorkultur in LB-Medium angeimpft und über Nacht inkubiert. Mit dieser Vorkultur ist die Hauptkultur so angeimpft worden, dass eine OD von 0,05 - 0,10 erhalten wurde. Die Bebrütung erfolgte bei 37 °C unter Schütteln unter regelmäßiger Kontrolle des Wachstums über die Messung der OD (OD<sub>600</sub>). Die *E. coli* Zellen wuchsen bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,6 und wurden dann bei 4 °C abzentrifugiert (10 min, 3000 UpM, Minifuge GL). Die Bakterien

wurden in 25% des Ausgangsvolumens eiskalter CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und 40 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden sie erneut wie oben beschrieben abzentrifugiert, in 5% des Ausgangsvolumens in eiskalter CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert, in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert und erneut 1-3 h auf Eis inkubiert. Die nun transformationskompetenten Bakterien wurden bis zur Verwendung bei -70 °C gelagert.

#### **2.2.3.4 Hitzeschock-Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien**

Zur Transformation wurden der Ligationsansatz bzw. 10-50 ng Plasmid-DNA zu 50 µl kompetenten *E. coli* Bakterien-Suspension gegeben und 20 min auf Eis inkubiert. Nach Durchführung eines Hitze-/Kälteschocks (2 min 42 °C, 1 min auf Eis) erfolgte die Zugabe von 200 µl LB<sup>++</sup>-Medium. Anschließend wurde der Ansatz 30-60 min bei 37 °C bebrütet, danach auf einer LB-Agarplatte mit dem gewünschten Selektions-Antibiotikum ausplattiert und 12-18 h bei 37 °C inkubiert. Die entstandenen Kolonien wurden zum Animpfen von „Minipreps“ verwendet.

#### **2.2.3.5 Plasmidpräparation für Test-/Kontrollzwecke**

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly 1979). 1,5 ml einer Übernachtskultur der zu testenden Bakterienklone wurden 5 min bei 5.000 UpM (Eppendorf-Zentrifuge) abzentrifugiert. Nach dem Resuspendieren der pelletierten Bakterien im verbleibenden Restmedium (ca. 50 µl) wurden 300 µl TENS/RNase (0,1 mg/ml RNaseA) zugegeben und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgten die Neutralisation mit 150 µl Natriumacetat für 5 min auf Eis und das Pelletieren der Proteine sowie der chromosomalen DNA (10 min, 14.000 UpM). Der plasmidhaltige Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die Plasmid-DNA mit 500 µl Isopropanol gefällt (15 min RT). Die Plasmid-DNA wurde abzentrifugiert (5 min, 14.000 UpM, Eppendorf-Zentrifuge), einmal mit 500 µl 70 %igem EtOH gewaschen und in der „Speed Vac“ getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 50 µl A. dest. aufgenommen und durch Schütteln gelöst. Für die Spaltung mit Restriktionsendonukleasen wurden 3 µl der DNA-Lösung in einem 20 µl Ansatz mit der gewünschten Endonuklease für 30-60 min inkubiert und auf einem Agarosegel aufgetrennt.

### 2.2.3.6 Plasmidpräparation zur Gewinnung größerer DNA-Mengen

Lösung S1:	Lösung S2:	Lösung S3:
50 mM Tris-HCl	0,2 M NaOH	2,8 M KAc
10 mM EDTA	1,0 % SDS (w/v)	in A. dest.
100 µg/ml RNase A		pH 5,1
pH 8,0		
Lösung N2:	Lösung N3:	Lösung N5:
0,90 M KCl	1,15 M KCl	1,00 M KCl
0,01 M Tris-HCl	0,10 M Tris-HCl	0,10 M Tris-HCl
15,00 % EtOH (v/v)	15,00 % EtOH (v/v)	15,00 % EtOH (v/v)
0,15 % Triton X-100	pH 6,3 mit H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	pH 8,5 mit H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
pH 6,30 mit Essigsäure	einstellen	einstellen
einstellen		

Größere Plasmidpräparationen wurden mit dem „Nucleobond®AX“-Kit durchgeführt. 100 ml einer Übernachtskultur in LB-Medium (mit 25 µl einer „Miniprep“ Startkultur angeimpft) wurden 10 min bei 5.000 UpM (Minifuge RF) in 50-ml-„Spitzboden-Röhrchen“ (Greiner) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 4 ml kalter Lösung S1 resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml S2 wurde der Ansatz durch vorsichtiges, mehrmaliges Invertieren des Röhrchens gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 4 ml Lösung S3. Der Ansatz wurde erneut vorsichtig gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Durch eine zwanzigminütige Zentrifugation bei 5.000 UpM (Minifuge RF) wurden die denaturierten Proteine und die chromosomale DNA abgetrennt. Der Überstand wurde auf die zuvor mit 2,5 ml N2 äquilibrierte Säule pipettiert. Nachdem die Lösung vollständig durchgelaufen war, wurde zweimal mit je 5 ml N3 gewaschen und schließlich die DNA mit 5 ml N5 von der Säule eluiert. Durch Zugabe des 0,7-fachen Volumens Isopropanol und Inkubation von 5 min bei RT erfolgte die Fällung der DNA. Anschließend wurde die DNA durch Zentrifugation bei 13.000 UpM und 4 °C in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen pelletiert, einmal mit 70%igem EtOH gewaschen und in 50 µl A. dest. aufgenommen.

### 2.2.4 Spektrophotometrische Analyse von Nukleinsäuren

Die Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren wurde anhand der UV-Absorption der DNA- oder RNA-Proben ermittelt (Sambrook, Fritsch, and Maniatis 1989). Dabei wurden in 100 µl Volumen am Spektrophotometer in Quarz-Küvetten Verdünnungen (meist 1:100) der Proben in Wasser gegen Wasser als Nullwert bei den Wellenlängen 260/280 nm gemessen. Die Konzentration von Nukleinsäure-Lösungen ergibt sich aus der Extinktion der Lösung bei 260 nm. Eine Extinktion<sub>260 nm</sub> von 1,0 entspricht bei einer Schichtdicke von 1 cm nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz einer Konzentration von 50 µg/ml bei doppelsträngiger DNA, 33 µg/ml bei einzelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml bei einzelsträngiger RNA.

Die Reinheit von Nukleinsäure-Lösungen errechnet sich aus dem Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm,  $E_{260 \text{ nm}}/E_{280 \text{ nm}}$ .

Das Verhältnis ist 1,8 - 2,0 bei reiner DNA bzw. 1,9 - 2,1 bei reiner RNA.

### 2.2.5 Methoden zur Isolierung und Analyse von RNA

Beim Umgang mit RNA wurde stets mit Handschuhen gearbeitet, um den Abbau der RNA durch Kontamination mit RNasen zu vermeiden.

#### 2.2.5.1 DEPC-Behandlung von Lösungen

Alle beim Arbeiten mit RNA verwendeten Lösungen (außer Tris-Lösungen und Elektrophoresepuffer) wurden mit DEPC behandelt. Durch das DEPC werden in den Lösungen befindliche RNasen irreversibel inaktiviert. Nach Zugabe von 0,1% DEPC wurde über Nacht bei RT gerührt und das DEPC anschließend durch Autoklavieren inaktiviert.

#### 2.2.5.2 RNA-Isolierung aus Zellen

RNA-Lysis-Mix:

6,0 M Guanidiniumisothiocyanat  
0,5 % Lauryl-Sarcosinat  
5,0 mM Natriumcitrat, pH 7,0  
0,1 M β-Mercaptoethanol

CsCl-Lösung:

5,7 M CsCl  
20,0 mM Tris-HCl, pH 6,8  
10,0 mM EDTA

Das Kulturmedium der Zellen einer Kulturschale mit einem Durchmesser von 10 cm wurde verworfen und die Zellen in 6 ml RNA-Lysis-Mix resuspendiert, wodurch eine Zellyse und eine Inaktivierung von RNasen erreicht wurden

(Chirgwin et al. 1979). Die Zellsuspension wurde in einem Polyallomer-Röhrchen auf ein 4,5 ml CsCl-Kissen geschichtet und für 21 h bei 36.000 UpM und 20 °C (Kontron-Ultra-Zentrifuge, SW 41-Rotor, Beckman) zentrifugiert. Aufgrund ihres hohen spezifischen Gewichtes (> 1,8 g/ml) wird die RNA pelletiert, während die anderen zellulären Komponenten (DNA, Lipide, Proteine) im Überstand bleiben. Nach Beendigung der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen, das Zentrifugenröhrchen auf den Kopf gestellt und der Boden mit einem heißen Skalpell abgeschnitten. Die RNA wurde in 200 µl H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> gelöst und durch Zugabe von 50 µl 1 M KAc, pH 5,2 und 1 ml absolutem EtOH für 30 min bei – 70 °C gefällt. Nach Verwerfen des Überstandes und einmaligem Waschen mit 70 %igem EtOH wurde die RNA in H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> gelöst. Die Lagerung der RNA-Lösung erfolgte bei – 20 °C.

### **2.2.5.3 RNA-Isolierung aus Zellen (peqGOLD Trifast™)**

Die Zellen wurden in der Zellkulturschale durch Zugabe von 1 ml „peqGOLD Trifast“ je Schale (Durchmesser 3,5 cm) mittels mehrmaligem Aufziehen mit der Pipette lysiert. Der Ansatz stand im Anschluss für 5 min bei Raumtemperatur, um die Dissoziation von Protein/Nukleotidkomplexen zu gewährleisten. Je eingesetztem Milliliter peqGOLD-Lösung wurden der Suspension 0,2 ml Chloroform zugesetzt und die Probe für 15 sec geschüttelt. Nach der Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur folgte ein Zentrifugationsschritt von 5 min mit 12.000 g, um eine Phasentrennung zu erreichen. Die wässrige Phase, welche die RNA enthält, wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die RNA mit 2-Propanol präzipitiert (0,5 ml Isopropanol je eingesetztem Milliliter peqGOLD Trifast-Lösung) Nach dem Mischen und Zentrifugieren (10 min, 4 °C, 12.000 g) der Probe wurde der isopropanolhaltige Überstand verworfen. Das Pellet wurde im Anschluss zweimal mit je 1 ml 75 %igem EtOH durch Vortexen und anschließendem Zentrifugieren gewaschen und nach dem Trocknen in H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> gelöst.

### **2.2.5.4 RNA-Agarosegelelektrophorese**

Zur Vermeidung intramolekularer Rückfaltungen der RNA und damit verbundenem verändertem Laufverhalten im Agarosegel wurde die RNA vor dem Auftragen mit Glyoxal behandelt (Carmichael and McMaster 1980) und ein

formaldehyd-haltiges Agarosegel verwendet (Keil, Ebeling-Keil, and Koszinowski 1984).

1-5 µg Gesamtzell-RNA oder 3 µl eines *in vitro* Transkriptionsansatzes wurden mit 3 µl 5x Phosphatpuffer, 1,8 µl 40 %igem Glyoxal und H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> in einem Gesamtansatz von 12,3 µl für 35-45 min bei 56 °C denaturiert und anschließend mit 3 µl Probenpuffer versetzt. Für die Herstellung eines 1 %igen Agarosegeles wurden 1,5 g Agarose mit 140 ml A. dest. im Mikrowellengerät aufgekocht. Unter Rühren erfolgte die Zugabe von 3 ml 50 x Phosphatpuffer. Nach Abkühlen auf ca. 60 °C wurden 21 ml einer 36,5 %igen Formaldehydlösung zugegeben und das Gel gegossen (Horizontalgel der Größe 14 x 25 cm). Nach Füllen der Kammer mit 1 x Phosphatpuffer wurden die Geltaschen mit den denaturierten Proben beladen. Die Auftrennung der RNA erfolgte bei einer Spannung von 4 V/cm (i.d.R. 100 V konstant) mit ständiger Pufferumwälzung für 4 h. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel 5-10 min in einer Acridinorangelösung (ca. 0,003%) gefärbt und anschließend 3 x 15 min in 1 x Phosphatpuffer entfärbt. Die aufgetrennte RNA wurde im UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht und das Gel mit einer Polaroid-Kamera fotografiert.

### **2.2.5.5 Northern-Blot**

#### **2.2.5.5.1 Transfer von RNA auf Filter**

Im Anschluss an die Färbung des RNA-Gels erfolgte der Transfer auf die Duralonmembran (Stratagene). Dazu wurde ein Gelträger mit der offenen Seite nach unten in eine große Wanne gestellt, die etwa 1 cm hoch mit Transferpuffer (20 x SSC) gefüllt war. Auf diesen Gelträger wurden zwei Lagen mit 20 x SSC befeuchtetem Filterpapier (Whatman 3MM) gelegt, dessen Länge so bemessen war, dass die Enden des Filterpapiers in die Transferlösung tauchten. Das Gel wurde mit den Taschen nach oben auf das Filterpapier gelegt. Als nächste Schichten folgten der genau gelgroße Duralonfilter und zwei gleich große Filterpapiere, die mit 20 x SSC angefeuchtet waren. Anschließend wurde ein Stoß trockenes, saugfähiges Papier aufgelegt und mit einem Gewicht (ca. 1 kg) beschwert. Über die Kapillarkräfte des Papiers wurde die Transferlösung durch das Gel gesaugt und die RNA auf die Nylonmembran transferiert (Sambrook, Fritsch, and Maniatis 1989). Der Transfer erfolgte in einer Zeit von mindestens

12 h. Nach dem Transfer wurde die „RNA-Leiter“ auf der Membran unter einer UV-Lampe (254 nm) sichtbar gemacht und mit einem Kugelschreiber markiert. Zur Zerstörung des Glyoxal, das die folgende Hybridisierung beeinträchtigt, und zur Fixierung der RNA auf der Membran wurde diese für 3-4 h bei 80 °C im Vakuum gebacken.

#### 2.2.5.5.2 RNA/DNA-Hybridisierung

Hybridisierungslösung:

1,00 mM EDTA  
0,25 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$   
0,25 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$   
7,00 % SDS

5 % Hybridisierungswaschlösung:

40,00 mM Phosphatpuffer, pH 7,0  
1,00 mM EDTA  
5,00 % SDS

1 % Hybridisierungswaschlösung:

40,00 mM Phosphatpuffer, pH 7,0  
1,00 mM EDTA  
1,00 % SDS

Die Hybridisierungen wurden in Glasröhren durchgeführt, die in Wärmeschränken mit 6 UpM rotierten. Die Hybridisierungstemperatur betrug 54 °C für heterologe Sonden bzw. 68 °C für homologe Sonden. Alle verwendeten Lösungen wurden im Wasserbad auf 54 bzw. 68 °C vorgewärmt. Zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen und Auswaschen von Acridinorange wurde die Nylonmembran mit der gebundenen RNA für 2 x 20 min in ungefähr 20 ml Hybridisierungslösung vorhybridisiert. Danach wurde diese Lösung durch 8 ml frische Hybridisierungslösung ersetzt und die hitzedenaturierte radioaktive Sonde zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht. Am folgenden Tag wurde der Filter einmal 30 min in 5 %iger Hybridisierungswaschlösung und zweimal je 30 min in 1 %iger Hybridisierungswaschlösung gewaschen, getrocknet und autoradiographisch ausgewertet.

## **2.2.6 Standard DNA-Techniken**

### **2.2.6.1 Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren**

Um Proteine aus wässrigen Nukleinsäurelösungen zu entfernen, wurden diese mit einem Volumen Phenol ausgeschüttelt (Sambrook, Fritsch, and Maniatis 1989). Die Proteine gelangen dabei in die Phenol- oder Interphase. Durch Zentrifugation bei 14.000 UpM (Eppendorf-Zentrifuge) für 4 min erfolgte die Phasentrennung. Nach Abnahme der oberen, nukleinsäurehaltigen wässrigen Phase und Überführung in ein frisches Gefäß wurde in gleicher Weise noch zweimal extrahiert: einmal mit 1:1 Phenol/Chloroform und abschließend nur mit Chloroform. Durch eine anschließende Ethanol-fällung wurde die Nukleinsäure weiter gereinigt und konzentriert.

### **2.2.6.2 Ethanol-fällung von DNA**

Die DNA-Lösung wurde mit 1/10 Volumen einer 3 M NaAc (pH 5,4) und dem 2,5fachen Volumen absolutem EtOH vermischt und für 30 min bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  oder auf Trockeneis inkubiert. Anschließend wurde die DNA 15 min mit 14.000 UpM bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Eppendorf-Zentrifuge) pelletiert. Zum Entfernen vorhandener Salzreste wurde die DNA mit 70 %igem EtOH gewaschen, danach im Vakuum bei Raumtemperatur getrocknet und in A. dest. gelöst.

### **2.2.6.3 Isopropanol-fällung von DNA**

Die DNA-Lösung wurde mit 1/10 Volumen 3 M NaAc (pH 5,4) und dem 0,7-fachen Volumen Isopropanol vermischt und für 5 min bei RT inkubiert. Das Pelletieren und Waschen der gefällten DNA erfolgten wie bei der EtOH-Fällung.

### **2.2.6.4 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen**

Zur Analyse und Klonierung von Plasmid-DNA wurde diese mit Restriktionsendonukleasen des Typs II behandelt, die spezifische Sequenzen in doppelsträngiger DNA erkennen und spalten können. Die Spaltung von DNA erfolgte nach den Vorschriften der Lieferanten der entsprechenden Enzyme unter Verwendung der mitgelieferten Puffer. Dabei wurden DNA-Konzentrationen von  $0,3\text{ }\mu\text{g/ml}$  nicht überschritten. Die Volumina betragen  $10\text{-}20\text{ }\mu\text{l}$  für analytische Spaltungen mit bis zu  $0,3\text{ }\mu\text{g}$  DNA und  $50\text{ }\mu\text{l}$  für

präparative Spaltungen mit 1-5 µg DNA. Die Enzyme wurden mit 2-5 U für 30 min bis 4 h eingesetzt.

#### **2.2.6.5 Herstellung glatter Enden an DNA-Molekülen**

Für die Ligation nicht kompatibler Enden nach Restriktionsenzymspaltung ist es z. T. notwendig, an DNA mit Einzelstrang-Überhängen glatte Enden zu erzeugen. Hierzu wurde das große Fragment der DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) verwendet, dem die 5'→3'-Exonukleaseaktivität fehlt. Mit Hilfe der noch vorhandenen 3'→5'-Exonukleaseaktivität und der 5'→3'-Polymeraseaktivität können durch Abbau eines 3'-Überhanges bzw. durch Auffüllen eines 5'-Überhanges der nicht kompatiblen Enden glatte Enden hergestellt werden.

Zum Auffüllen von 5'-Überhängen wurde die DNA (bis zu 0,25 µg/µl) in 1 x Klenow-Puffer gelöst und mit 1 Einheit Klenow-Fragment pro µg DNA bei 37 °C 15 min mit dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 125 µM) inkubiert. Sollten 3'-Überhänge entfernt werden, so wurden die dNTPs erst nach 5 min Inkubation von DNA mit Enzym bei 37 °C zugegeben. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde eine Phenol/Chloroformextraktion mit anschließender Ethanolfällung der DNA durchgeführt.

Eine alternative Methode stellt die Verwendung von T4-DNA-Polymerase dar. DNA-Mengen, Nukleotidkonzentrationen und Inkubationszeiten entsprechen denen der Behandlung mit Klenow-Polymerase, aber mit T4-DNA-Polymerase kann i. d. R. im Puffer der vorhergehenden DNA-Spaltung gearbeitet werden.

#### **2.2.6.6 Dephosphorylierung von DNA**

In linearisierte Plasmide, die kompatible Enden besitzen, lassen sich nur schwer DNA-Fragmente einsetzen, da der größte Teil der Plasmide religiert. Um diese Rückligation zu verhindern, werden die 5'-Phosphate der Plasmid-DNA durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase (CIP oder SAP) abgespalten. Zur Dephosphorylierung wurden 1-2 µg linearisierte DNA mit 1-2 Einheiten alkalischer Phosphatase in 1 x AP-Puffer versetzt und in 50 µl Volumen für 30 min bei 37 °C inkubiert. Dieser Schritt kann auch bereits parallel zur Spaltung durchgeführt werden. Danach wurden eine Phenol/Chloroformextraktion mit anschließender Ethanolfällung (CIP) oder nur eine Hitzeinaktivierung (SAP) durchgeführt.

### **2.2.6.7 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase**

Die T4-DNA-Ligase katalysiert mit Hilfe von ATP und  $Mg^{2+}$ -Ionen die Ausbildung einer kovalenten Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe und der 3'-Hydroxylgruppe von DNA-Molekülen. Für die Ligation wurden ungefähr 100-500 ng DNA pro Reaktionsansatz (30  $\mu$ l) in 1 x Ligationspuffer mit 3 U T4-DNA-Ligase versetzt. Die Ligation erfolgte entweder für 16 h bei 15 °C oder für 4 h bei RT. Die molaren Verhältnisse der Ligationspartner (Insert : Plasmid) lagen bei 3 : 1 für die gerichtete Klonierung („sticky end“) und bei 5 : 1 für die Ligation glatter Enden („blunt end“).

### **2.2.6.8 DNA-Agarosegelelektrophorese**

Die Agarosegelelektrophorese wurde als Standardmethode zur Analyse und Reinigung von DNA-Fragmenten eingesetzt.

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden horizontale, 0,6-1,5 %ige (w/v) Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer (mit 100 ng/ml EtBr) in der Mikrowelle durch Kochen gelöst und in die Horizontalgelapparaturen gegossen. Nach dem Erstarren wurde das Gel mit 1 x TAE (mit 100 ng/ml EtBr) überschichtet, die DNA-Proben mit 0,1-fachem Volumen Probenpuffer versetzt und aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 4-8 V/cm (i.d.R. 110 V konstant). Als Längenstandard wurde parallel zu den Proben ein kommerziell erhältlicher Standard aufgetrennt. Nach dem Gellauf konnten die DNA-Fragmente im UV-Licht (254/302 nm) sichtbar gemacht und fotografiert werden.

### **2.2.6.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Die Isolierung von DNA aus der Agarose erfolgte mit Hilfe des NucleoTrap Kits oder des QIAEX-Kits nach Angaben der Hersteller. Das Prinzip beider Kits beruht auf der Bindung von Nukleinsäuren an Glaspartikel (Vogelstein and Gillespie 1979). Nach der Restriktionsenzymspaltung wurden die DNA-Fragmente im Agarosegel aufgetrennt, das gewünschte DNA-Fragment unter UV-Licht (302 nm) aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach Auflösung der Agarose in einer Lösung chaotroper Salze und Zugabe der Glaspartikelsuspension erfolgte die Bindung der DNA an die Glasmatrix. Nach mehreren Waschschritten wurde die DNA vom Trägermaterial

durch Inkubation in A. dest. bzw. einem niedermolaren Tris-Puffer mit pH 7,5 abgelöst.

#### **2.2.6.10 Radioaktive Markierung von DNA durch „Nick Translation“**

Zur radioaktiven Markierung durch „Nick Translation“ werden durch das Enzym DNase I zufallsmässig offene Phosphodiesterbindungen („nicks“) in einem doppelsträngigen DNA-Molekül erzeugt. Mit Hilfe der 5'→3'-Exonukleaseaktivität der DNase I werden weitere Nukleotide entfernt und bei der Polymerasereaktion durch neue Nukleotide ersetzt. Da die eingesetzten dCTP-Nukleotide an der  $\alpha$ -Position [ $^{32}\text{P}$ ]-markiert sind, wird die neu synthetisierte DNA radioaktiv markiert (Rigby et al. 1977). Die Markierungsreaktion wurde mit dem „Nick Translation Kit“ (Amersham) durchgeführt. Das zu markierende DNA-Fragment wurde aus einem Agarosegel eluiert. Maximal 50 ng des Fragmentes wurden mit 4  $\mu\text{l}$  dNTP-Mix, 30  $\mu\text{Ci}$   $\alpha$ -[ $^{32}\text{P}$ ] dCTP und 2  $\mu\text{l}$  Enzymlösung in einem Gesamtansatz von 20  $\mu\text{l}$  für 60-90 min bei 15 °C inkubiert. Durch Zugabe von 80  $\mu\text{l}$  Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 5 mM EDTA, 0,5% SDS) wurde die Reaktion gestoppt. Freie Nukleotide sind anschließend durch Zentrifugation über eine Sephadex G-50 Säule abgetrennt worden. Die Messung der radioaktiv markierten Sonde erfolgte im Radioaktivitätsmeßgerät Mini Assay Typ 6-20. Die Sonde wurde vor der Zugabe zur Hybridisierungslösung 3 min auf 95 °C erhitzt, um die DNA-Doppelstränge in Einzelstränge zu trennen.

#### **2.2.6.11 Gelfiltration von Nukleinsäuren**

Um einzelne Nukleotide von längeren Nukleinsäuremolekülen abzutrennen, wurde eine Gelfiltration durchgeführt. 1 ml Spritzen wurden mit zwei passend zugeschnittenen Glasfaserfiltern (Whatman GF/C) abgedichtet und mit Sephadex G-50 (für Moleküle größer als 50 Nukleotide) bzw. Sephadex G-15 (für Oligonukleotide) gefüllt (Säulenmaterial in 1 x TE äquilibriert, entgast und autoklaviert). Das Gelbett wurde durch Zentrifugation im Ausschwingrotor 2 min von der Flüssigkeit befreit (2.000 UpM, Minifuge). Die Probe wurde in einem Gesamtvolumen von 100  $\mu\text{l}$  auf die Säule aufgetragen und 2 min bei 2.000 UpM zentrifugiert. Der Säulendurchfluss wurde in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß aufgefangen.

## 2.2.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

### 2.2.7.1 Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

a) 2,5x RT-Puffer R VIIIa:	5x PCR-Puffer R VIIIb:
125,00 mM Tris, pH 8,3	25,00 mM Tris, pH 8,3
187,50 mM KCl	100,00 mM KCl
7,50 mM MgCl <sub>2</sub>	6,50 mM MgCl <sub>2</sub>
25,00 mM DTT	1,25 mM dNTPs
1,25 mM dNTPs	0,50 % Triton X-100
	0,10 % BSA

Lagerung beider Puffer bei -20 °C

RT-Mix:	PCR-Mix (je Ansatz 48 µl):
8,00 µl 2,5x RT-Puffer R VIIIa	10,00 µl 5x PCR-Puffer R VIIIb
0,25 µl RNasin (10 U)	30,00 pM Plusstrang-Primer
0,25 µl RT (50 U)	30,00 pM Minusstrang-Primer
	2,00 U Taq-DNA-Polymerase

5 µg Gesamtzell-RNA und 30 pM Minusstrang-Primer wurden gemischt und mit H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> auf ein Gesamtvolumen von 11,5 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde 3 min bei 94 °C denaturiert und danach auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 8,5 µl RT-Mix erfolgte die reverse Transkription bei 37 °C für 45 min. Durch 2-minütiges Erhitzen des Ansatzes auf 80 °C wurde das RNA/DNA-Hybrid aufgeschmolzen, anschließend für 2 min auf Raumtemperatur abgekühlt und danach auf Eis gestellt. Pro Ansatz wurden dann 2 µl des RT-Produktes entnommen und dem PCR-Mix zugegeben und die Polymerasekettenreaktion (PCR) gestartet. Standardansätze mit folgenden Zyklusparametern:

Denaturierung: 94 °C, 30 sec  
Annealing: 45-64 °C, 30 sec  
Elongation: 72 °C, 60 sec (in Abhängigkeit der erwarteten  
Fragmentgröße)  
Zahl der Zyklen: 30-35  
finaler Elongationsschritt: 72 °C, 10 min

### b) Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Qiagen<sup>®</sup> OneStep RT-PCR Kit

Der Qiagen<sup>®</sup> OneStep RT-PCR Kit wurde nach den Angaben des Herstellers eingesetzt. Bei dieser Reaktion wurde Gesamtzell-RNA einer Konzentration von 1 pg – 5 µg eingesetzt. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt neben der RNA noch je 10 pmol Plus- und Minusstrang-Primer, 10 µl „5 x Qiagen OneStep RT-PCR Puffer“, 2 µl dNTP-Mix (10 mM je Nukleotid), 10 µl „Q-Puffer“, 0,5 µl RNase Inhibitor (10 U/µl), 2 µl „Qiagen OneStep RT-PCR Enzym Mix“ und H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> zum Auffüllen auf das Reaktionsvolumen von 50 µl. Der verwendete „Q-Puffer“ bewirkt durch eine Herabsetzung der „Schmelztemperatur“ der eingesetzten RNA das Auflösen von Sekundärstrukturen der RNA.

Standardansätze mit folgenden Parametern:

RNA Transkription: 50 °C, 30 min  
Initialer RCR Schritt: 94 °C, 15 min  
Denaturierung: 94 °C, 30 sec  
Annealing: 30-64 °C, 30 sec  
Elongation: 72 °C, 60 sec (in Abhängigkeit der erwarteten  
Fragmentgröße)  
Zahl der Zyklen: 30-35  
finaler Elongationsschritt: 72 °C, 10 min

#### 2.2.7.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Es wurden ca. 1-10 ng des DNA-Templates mit je 10 pmol Plus- und Minusstrang-Primer, 2,5 µl 10 x PCR-Puffer (Appligene), 1,6 µl dNTPs sowie 2 U Taq-Polymerase versetzt und auf ein Gesamtvolumen von 25 µl mit A. dest.

aufgefüllt. Die PCR wurde von Saiki (Saiki et al. 1985; Saiki et al. 1988) als Methode eingeführt. Für Standardansätze wurden die PCR-Parameter abgeschätzt mit den Annahmen, dass Taq-Polymerase etwa 1 kb je min synthetisiert und die Hybridisierungs-Temperatur der Primer mit der „2+4-Regel“ bestimmt werden kann.

„2+4-Regel“:  $2 \times (A+T) + 4 \times (C+G) - 4 \approx \text{Annealtemperatur in } ^\circ\text{C}$

A,C,G und T stellen jeweils die in der Primersequenz vorkommende Anzahl entsprechender Nukleotide dar.

### **2.2.7.3 Quantitativ-kompetitive PCR**

Bei der kompetitiv-quantitativen PCR wird ein interner Standard und die zu bestimmende Probe mit den gleichen Primern amplifiziert. Da die Probe und der Standard im gleichen Reaktionsgefäß unter denselben Reaktionsbedingungen amplifiziert werden, können Variationen, die zwischen einzelnen Reaktionsansätzen auftreten, vernachlässigt werden; folglich ist eine absolute Quantifizierung des spezifischen Ausgangsmaterials möglich. Unterschiedliche Mengen des Standards werden mit einer konstanten Menge der Probe ko-amplifiziert und die Amplifikatmenge bestimmt.

## **2.2.8 Sequenzierung von DNA**

### **2.2.8.1 Sequenzierung von Plasmid-DNA**

Für Sequenzierungen von Plasmid-DNA und PCR-Fragmenten wurde der „BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ von Applied Biosystems verwendet. Dabei handelt es sich um ein Polymerisations-Kettenabbruch-System (Sanger, Nicklen, and Coulson 1977), bei dem die zum Abbruch führenden Nukleotidderivate vier verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe tragen (Smith et al. 1986). Somit ist die Analyse einer Sequenz auf einer Gelspur möglich. Zur Sequenzierung von Plasmid-DNA wurden 1,5 µg DNA pro Ansatz verwendet; DNA aus (RT-)PCR-Ansätzen wurde mit Hilfe des NucleoTrap Kits gereinigt und dann 5 µl der jeweiligen gereinigten DNA eingesetzt. Die Sequenzreaktion wurde mit dem „ABI™ PRISM BigDye

Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit" (Applied Biosystems) durchgeführt.

Reaktionsansatz:            1,0 µg zu sequenzierende DNA  
                                  3,6 pM Oligonukleotid-Primer  
                                  3,0 µl Reaktionsmix BigDye-Kit  
                                  ad 10,0 µl Aqua bidest.

Die Sequenzreaktionen wurden im 9600-PCR System von Perkin-Elmer durchgeführt.

Reaktionsbedingungen: 24 Zyklen mit je:  
                                  30 sec 96 °C, 15 sec 50 °C, 4 min 60 °C  
                                  Kühl- und Lagerschritt auf 4 °C

Der Reaktionsansatz wurde anschließend mit 56 µl Ethanol (100%) und 26 µl A. dest. gemischt, 5 Minuten bei RT gefällt, 60 Minuten mit 14.000 UpM zentrifugiert (Eppendorfzentrifuge), mit 100 µl Ethanol (75%) gewaschen und getrocknet. Dieses getrocknete Pellet wurde bis zur Analyse auf einem Sequenzgel bei -20 °C gelagert. Zur elektrophoretischen Auftrennung der sequenzierten Reaktionsprodukte wurde die Probe in 3,5 µl Probenpuffer für DNA-Sequenzgele resuspendiert und drei Minuten bei 95 °C denaturiert. Von diesem Ansatz wurden 1,7 µl auf das Gel aufgetragen.

### **2.2.8.2 Elektrophorese von Sequenzreaktionen im Harnstoff-Acrylamid-Gel**

Die Sequenzreaktionen der DNA-Proben wurden durch Elektrophorese in 7 M Harnstoff-5,25%-Acrylamid-Gelen (Long Ranger) in 1x TBE im ABI PRISM 377 DNA Sequencer mit einer Trennstrecke von 48 cm analysiert. Das System wurde nach Angaben des Herstellers installiert.

Die Gel-Mischung wurde durch Nitrocellulose mit 0,2 µm Porendurchmesser und Anlegen eines Vakuums filtriert und entgast. Nach Zugabe von 300 µl APS (10%) und 42 µl TEMED wurde das Sequenzgel zwischen die montierten Glasplatten gegossen. Nach Auspolymerisieren des Gels erfolgte der Einbau in die Apparatur mit 1 x TBE als Elektrophorese-Puffer.

Sobald beim Vorlauf (1.000 V, 50 W, 35 mA) eine Betriebstemperatur von 51 °C erreicht war, wurden die Proben aufgetragen und der Hauptlauf gestartet

(1.200 V, 150 W, 50 mA). Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte automatisch (Programm: DNA Sequencing Analysis Software, Version 2. 1.1).

### **2.2.9 Gerichtete Mutagenese, (Pfu-Mutagenese)**

Die Mutagenesen wurden mittels PCR durchgeführt. Dazu wurden Plasmide, die die fragliche Sequenz enthielten, für eine PCR eingesetzt, bei der die gewünschte Mutation über komplementäre, die Mutation tragende Primer eingeführt wurde. Im Anschluss an diese Reaktion erfolgte die Zugabe von 1 µl Dpn I, das methylierte DNA schneidet und somit die Ausgangsplasmide zerstört. Das nichtmethylierte intakte PCR-Produkt wurde nach der Reinigung mit dem NucleospinExtract-Kit für die anschließende Transformation eingesetzt. Das Vorhandensein der entsprechenden Mutation wurde durch Testspaltungen bzw. Sequenzierung von „Mini-Prep“-DNA überprüft.

### **2.2.10 *In vitro* Transkription**

3 µg Plasmid-DNA wurden durch einen Restriktionsenzymchnitt, der nicht zu überhängenden Enden führt, linearisiert und mit Phenol/Chloroform extrahiert. Das Restriktionsenzym wurde so ausgewählt, dass die Spaltung am 3'-Ende der zu transkribierenden Sequenz erfolgte. Für die Ethanol-fällung wurden die übliche Menge an EtOH, aber 1/8 Volumen 2 M KAc, pH 5,6, statt des sonst verwendeten 1/10 Volumens 3 M NaAc zugesetzt. Die getrocknete DNA wurde in 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> aufgenommen und für die *in vitro* Transkription mit der T7-RNA-Polymerase verwendet. In einem Gesamtansatz von 50 µl in 1 x Transkriptionspuffer wurden neben der linearisierten DNA 2,3 µg BSA (Dnase- und RNase-frei), 0,5 µl 1M DTT, 15 U des RNase-Inhibitors RNasin, 50 U T7-RNA-Polymerase und 0,5 mM der einzelnen Nukleotide (ATP, CTP, UTP, GTP) eingesetzt. Der Transkriptionsansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert. Da die transkribierten RNAs zur Transfektion in Zellen eingesetzt wurden, erfolgte anschließend eine Aufreinigung über eine Sephadex G-50 Säule. Nach Phenol/Chloroformextraktion und Ethanol-fällung wurde die getrocknete RNA in 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> aufgenommen. Zum Test wurden 3,5 µl in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und nach Acridinorange-Färbung die Qualität der RNA bewertet. Für die Transfektion von MDBK- bzw. SK6-Zellen wurden 5 µl der transkribierten RNA eingesetzt.

## 2.2.11 Proteinanalytische Methoden

### 2.2.11.1 Radioimmunpräzipitation

RIP-Grundpuffer:	1,0 % Triton (alt):	1,0 % Triton (neu):
20 mM Tris	1,0 % Triton X-100	1,0 % Triton X-100
100 mM NaCl	0,1 % Desoxycholat	0,5 % Desoxycholat
1 mM EDTA	0,1 % SDS	0,1 % SDS
2 mg/ml BSA	in RIP-Grundpuffer	in RIP-Grundpuffer
pH 7,6		

0,2 % Triton (neu):	25,0 % Sucrose:
0,2 % Triton X-100	25,0 % Sucrose (w/v)
in RIP-Grundpuffer	1,0 % Triton X-100
(ohne BSA)	0,5 % Desoxycholat
	0,1 % SDS
	in RIP-Grundpuffer

Die radioaktiv markierten Zellen wurden in 500 µl 1 %igem Triton-Puffer (alt) und 50 µl 10 %iger SDS-Lösung lysiert, 10 min bei 95 °C inkubiert und danach 20 sec im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurde das Antigenmaterial zunächst bei 5.000 UpM in der Eppendorfzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand in Ultrazentrifugenröhrchen überführt. Die Pelletierung von unlöslichen Zellbestandteilen erfolgte für 60 min bei 45.000 UpM (TLA45-Rotor, TL100-Zentrifuge, Beckmann). Die Überstände wurden mit dem 4fachen Volumen an 1 %igem Triton-Puffer (alt) verdünnt und die Radioaktivität eines 5 µl-Aliquots, versetzt mit 50 µl A. dest. und 2 ml Szintillationsgemisch in einem Szintillationszähler bestimmt. Zu einer Probenmenge mit 10<sup>6</sup> cpm wurde der erste Antikörper (5 µl der Kaninchenserum, 50 µl der mAk) zugegeben. Nach je einstündiger Inkubation bei 37 °C und 4 °C erfolgte die Zugabe einer fixierten Staphylococcus aureus Suspension (Kessler 1981). Die Proben wurden danach für 30 min bei RT inkubiert und dabei alle 10 min geschüttelt. Anschließend ruhten die Proben 30 min oder über Nacht bei 4 °C. Über die Wechselwirkung zwischen dem Staphylococcus aureus Protein A und dem F<sub>c</sub>-Teil der Antikörper kommt es zur Ausbildung von Proteinkomplexen, die durch Zentrifugation sedimentiert werden können. Durch Waschen werden die Bakterien-Protein-

Komplexe von ungebundenem Protein und freien, markierten Aminosäuren getrennt. Dazu wurden die Präzipitate resuspendiert, mit 500 µl Sucrose-Lösung unterschichtet und pelletiert (25% Sucrose, 5 min, 4.500 UpM, Tischzentrifuge). Die Überstände wurden abgesaugt und die Proben in 1 ml 1 %igem Triton-Puffer (neu) resuspendiert und bei 4.000 UpM (Eppendorf-Zentrifuge) für 4 min zentrifugiert. Nach erneutem Waschen der sedimentierten Komplexe mit 0,2 %igem Triton-Puffer wurden die Pellets in 10 µl einer Mischung aus 3 ml 0,2 %igem Triton und 7 ml A. dest. aufgenommen. Nach Zugabe von 40 µl Probenpuffer mit 5% β-Mercaptoethanol wurden die Proben für 3 min auf 95 °C erhitzt und 10 min bei 10.000 UpM (Eppendorf-Zentrifuge) zentrifugiert. Der Überstand mit den freigesetzten Proteinen wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die Radioaktivität von 5 µl-Aliquots mit einem Szintillationszähler bestimmt. Entsprechend der Radioaktivitätsmenge wurde die Menge des Probenmaterials ermittelt, die dann in einer SDS-PAGE aufgetrennt wurde.

### 2.2.11.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-PAGE wurde nach der Anleitung von (Schägger and von Jagow 1987) bzw. (Doucet and Trifaro 1988) durchgeführt. Während die „Jagow-Gele“ vorwiegend für die Auftrennung von Proteinen mit niedrigen Molekulargewichten verwendet wurden, erfolgte die Analyse von NS2/3 und NS3 in „12 %igen-Doucet-Gelen“.

Lösungen für „Jagow-Gele“:

Acrylamidlösung 30:1:     40,00 % Acrylamid (w/v),  
                                  1,33 % N,N'-Methylenbisacrylamid (w/v)  
                                  in A. dest.

Gelpuffer:                   3,0 M Tris-HCl, pH 8,45  
                                  0,3 % SDS  
                                  in A. dest.  
                                  (im Trenngel 1:3, im Sammelgel 1:4 verdünnt)

## MATERIAL UND METHODEN

---

10 x Anodenpuffer: 2,0 M Tris-HCl, pH 8,9

10 x Kathodenpuffer: 1,0 M Tris, pH 8,25  
1,0 M Tricin,  
1,0 % SDS

Lösungen für „Doucet-Gele“:

Acrylamidlösung 100:1: 40,00 % Acrylamid (w/v),  
1,33 % N,N'-Methylenbisacrylamid (w/v)

2 x Sammelgelpuffer: 140 mM Tris-HCl, pH 6,7

2 x Trenngelpuffer: 400 mM Tris, pH 9,0  
200 mM Glycin, pH 9,0

5 x Elektrophoresepuffer: 500,0 mM Tris, pH 8,4  
750,0 mM Glycin  
0,5 % SDS

Anodenpuffer: 0,5 x Elektrophoresepuffer

Kathodenpuffer: 1 x Elektrophoresepuffer

Die Glasplatten (18 cm x 16 cm) für die Proteingele wurden mit Aceton gereinigt und nach Einlage von zwei 1,5 mm „Spacern“ in die Gießvorrichtung (SE 6015, Amersham Bioscience) eingespannt. Anschließend wurde die Trenngellösung (i.d.R. 10-12 % für Jagow-Gele) im Vakuum entgast, das Gel nach APS- und TEMED-Zugabe bis ca. 3,5 cm unter den oberen Rand der Glasplatten gegossen und mit A. dest. überschichtet. Das Trenngel wurde 2-24 h nach dem Gießen mit einem 4 %igen Sammelgel überschichtet und ein 15-Taschen-Kamm (für analytische Gele) eingelegt (SE 511-15-1,5, Amersham Bioscience). Nach 30 min wurde der Kamm aus dem polymerisierten Sammelgel entfernt, die Geltaschen mehrfach mit A. dest. und Kathodenpuffer gespült und anschließend die zuvor für 3 min auf 95 °C erhitzten Proben aufgetragen. Nach Überschichtung der Proben mit Kathodenpuffer wurde das Gel in die

48

Vertikalapparatur eingespannt und 600 ml Kathodenpuffer in die obere Kammer (SE 6054, Amersham Bioscience) und 1,4 l Anodenpuffer in die untere Kammer (SE 6056) eingefüllt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei konstanter Spannung (60-75 V) über eine Dauer von 12-18 h. Als Molekulargewichtsstandards dienten [<sup>14</sup>C] radioaktiv markierte Proteine (N-terminale Methylierung).

### **2.2.11.3 Gelbehandlung und Fluorografie**

Nach der Elektrophorese wurde das Gel 20-60 min in Fixierlösung mit Coomassie-Farbstoff geschwenkt. Nach der Fixierung wurde das Gel mindestens 2,5 h in 3% Glycerin / 20% Methanol in Wasser geschwenkt, auf Whatmann 3MM-Filterpapier aufgezogen, 2 h bei 60 °C getrocknet und anschließend exponiert. Die Filme wurden in einer Entwicklermaschine automatisch entwickelt und getrocknet.

Alternativ zur Autoradiographie wurden die Gele mittels Phosphoimager analysiert (Exposition bei RT über Nacht oder für 2 Tage). Die Nutzung eines Phosphoimagers ermöglichte die quantitative Analyse der Signale. Der Grad der Signalstärke auf den Röntgenfilmen bzw. der Phosphoimager-Platte ist in gewissen Grenzen proportional zur vorhandenen Proteinmenge.

Die am Phosphoimager ermittelten Signalstärken einzelner Banden wurden mit Hilfe des Programms Tina 2.0 ausgewertet. Zur Ermittlung der Spalteffizienzen von NS2/3 wurde das radioaktive Signal einzelner Gelspuren bestimmt, so dass sowohl das von NS2/3 ausgehende Signal als auch das von NS3 ausgehende Signal erfasst wurden. Die Signalstärke wurde durch „Peaks“ im Profil dargestellt, wobei die „Peak“-Fläche ein Maß für die Signalintensität darstellt, die in PSL („phosphostimulated luminescence“) angegeben wird. Die gemessenen Werte wurden für die Berechnung der Spalteffizienzen herangezogen, wobei die Anzahl der Aminosäuren Methionin und Cystein in den verschiedenen NS2/3- bzw. NS3-Proteinen berücksichtigt wurde.

### **2.2.12 Western-Blot (Towbin, Staehelin, and Gordon 1979; Burnette 1981)**

1x Semi-dry-Puffer:        48,000 mM Tris, pH 8,6  
                                  39,000 mM Glycin  
                                  0,005 %    SDS  
                                  18,000 %    Methanol

Der Transfer gelelektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran mit 0,2 µm Porengröße wurde mit der Amersham Bioscience-Blot-Apparatur nach dem Semi-dry-Verfahren durchgeführt, mit 1x Semi-dry-Puffer als Transfer-Flüssigkeit. Es wurde 1 bis 1,5 h mit 105 mA transferiert.

Um eine unspezifische Bindung der für die Analyse verwendeten Antikörper zu verhindern, wurde die Membran etwa 1 h bei RT in PBS-T (PBS mit 0,1% Tween 20) mit 2,5% Magermilchpulver geschwenkt. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für zwei Stunden oder über Nacht (4 °C) mit dem ersten, spezifisch gegen das Zielprotein gerichteten Antikörper in PBS-T. Nach drei Waschschritten von jeweils 15 min mit PBS-T erfolgte die ein bis zwei stündige Inkubation mit dem zweiten Antikörper, ebenfalls in PBS-T. An den zweiten, speziesspezifischen Antikörper war Peroxidase (PO) gekoppelt. Die Membran wurde in einer Mischung aus Supersignal 1, Supersignal 2 (Pierce) und PBS-T im Verhältnis 1:1:3 für drei Minuten geschwenkt. Diese Detektionslösung wurde verworfen und die Membran leicht mit einem Whatman-Filterpapier abgetupft. Zur Detektion der Signale wurde sofort ein Film für fünfzehn Sekunden bis fünfzehn Minuten aufgelegt.

### **2.2.13 Software**

Die Analyse und der Vergleich von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen wurde mit Hilfe der University of Wisconsin Genetics Computer Group (UW-GCG) Software (Devereux et al., 1984), Version 10.0 durchgeführt.

Zur Darstellung von Pasmiden wurden die Freeware „pDraw32 1.0“ Revision 1.1.69 von Acaclone verwendet.

Die Auswertung der Daten der Phosphoimager-Analysen erfolgte mit Hilfe des Programms „Tina“, Version 2.0, das werksseitig mitgeliefert wurde.

Die Auswertung der Daten der Sequenzanalysen erfolgte mit Hilfe des Programms „DNA Sequencing Analysis Software“, Version 2.1.1, das werksseitig mitgeliefert wurde.

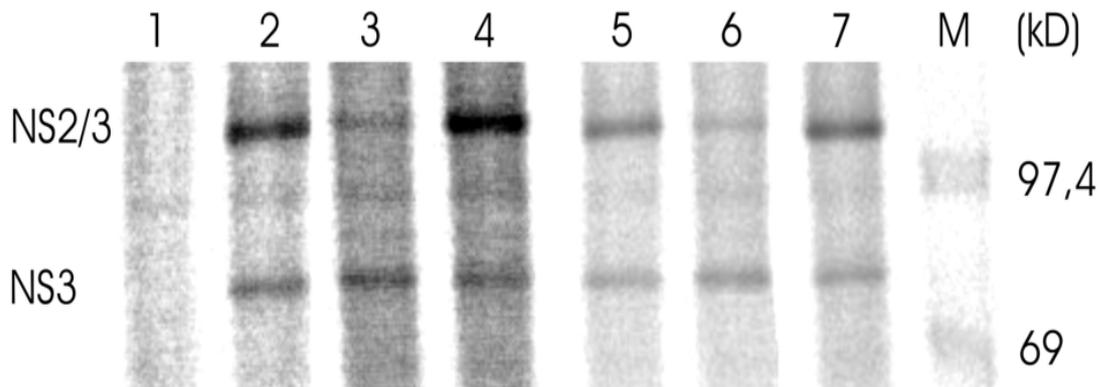
### **3. Ergebnisse:**

#### **3.1 NS2/3-Spaltung bei CSFV**

##### **3.1.1 Spalteffizienzen bei verschiedenen CSFV-Typen**

###### **3.1.1.1 Nachweis der Expression des NS3**

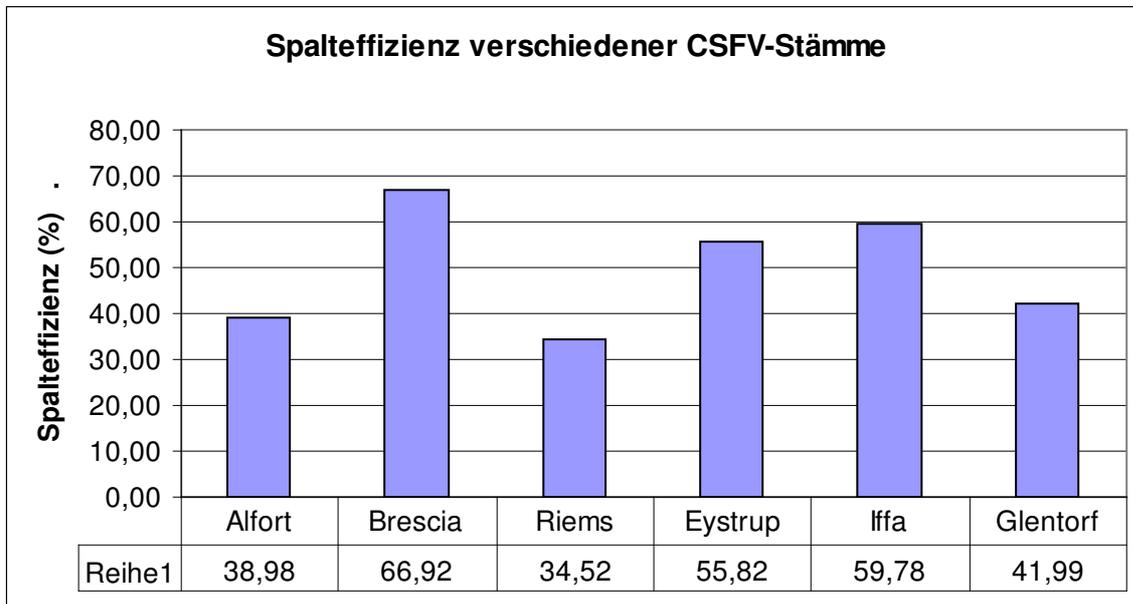
Das Virus der klassischen Schweinepest (CSFV) und alle BVD-Viren exprimieren das ca. 80 kD große Protein NS3 in der frühen Phase der Infektion. Verantwortlich für die Freisetzung des NS3 aus dem Polyprotein sind die kürzlich nachgewiesene Autoproteaseaktivität des NS2 und die NS3 Protease (Lackner et al. 2004). Die NS3 Protease spaltet am eigenen Carboxyterminus, während der Aminoterminus in der Regel durch die Proteaseaktivität im NS2 erzeugt wird. In der späteren Phase der Infektion wird bei nzp BVDV die Freisetzung des NS3 zugunsten des ungespaltenen NS2/3 herunter reguliert, während bei zp BVDV NS3 konstitutiv in großen Mengen freigesetzt wird. Mit CSFV infizierte Zellen zeigen im Gegensatz zu mit zp BVDV inokulierter Zellkultur in der späteren Phase der Infektion keinen zytopathogenen Effekt, obwohl auch sie NS3 konstitutiv exprimieren. Proteinanalysen ergaben Hinweise darauf, dass die Menge an NS3 geringer ist als bei zp BVDV. Dies führte zu der Hypothese, dass die Menge des exprimierten NS3 einen entscheidenden Einfluss auf das Auftreten eines ZPE hat. Um die Expression von NS3 verschiedener CSFV-Typen zu untersuchen und zu quantifizieren, wurden SK6-Zellen mit den Viren mit jeweils einer m.o.i. von 1 infiziert und 24 h nach Infektion mit [<sup>35</sup>S] Methionin / [<sup>35</sup>S] Cystein metabolisch markiert. Für die gewünschte Darstellung des NS3 wurde eine Radioimmunpräzipitation durchgeführt. Hierfür wurde das anti-A3-Serum verwendet, das gegen ein bakterielles Fusionsprotein gerichtet ist, welches die AS 1750-2349 des Polyproteins von CSFV Alfort/Tübingen umfasst und mit dem NS3 und NS2/3 verschiedener Pestiviren reagiert (Thiel et al. 1991). Die Analyse der präzipitierten Proteine nach Doucet-SDS-PAGE und Fluorographie zeigte, dass in den mit CSFV infizierten Zellen neben NS2/3 auch NS3 in unterschiedlichen Mengen exprimiert wurde (Abb. 3).



**Abb. 3: Radioimmunpräzipitation zur NS2/3-Spaltung von Viren der klassischen Schweinepest.**

Nach metabolischer Markierung mit [<sup>35</sup>S] Methionin / [<sup>35</sup>S] Cystein wurden Extrakte infizierter Zellen hergestellt und für die Immunpräzipitation eingesetzt. Die Präzipitation erfolgte mit dem anti-A3-Serum. Die Präzipitate wurden durch SDS-PAGE (12% PAA, Gelsystem nach Doucet/Trifaro) unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Die Zahlen am rechten Rand geben die Molekulargewichte von Standardproteinen in kD an. Die Quantifizierung der NS2/3 Spaltung der von den einzelnen Viren exprimierten NS2/3- und NS3-Proteine ist in Abb. 4 zu sehen.

Spur 1: nicht infizierte Zellen, Spur 2: Stamm Alfort/Tübingen, Spur 3: Stamm Brescia,  
 Spur 4: Stamm Riems, Spur 5: Stamm Eystrup, Spur 6: Stamm Iffa,  
 Spur 7: Stamm Glentorf, M: Größenmarker



**Abb. 4: NS2/3 Spalteffizienz verschiedener CSFV-Stämme.**

Dargestellt sind die Spalteffizienzen der verschiedenen CSFV-Stämme. Für die Ermittlung der angegebenen Werte wurden für alle Viren drei unabhängige Experimente durchgeführt. Die Proteine wurden aus den Zellextrakten jeweils mit dem anti-A3-Serum präzipitiert und die Präzipitate mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Mit Hilfe des Phosphor-Imagers wurde die Stärke der NS2/3- und NS3-Signale ermittelt. Unter Berücksichtigung der Zahl der Methionine und Cysteine in den jeweiligen NS2/3- bzw. NS3-Proteinen wurde der prozentuale Anteil des NS3 an der Gesamtmenge von NS3 / NS2/3 berechnet. Die für jedes Virus aus den unabhängigen Experimenten ermittelten drei Werte wurden gemittelt und hier als prozentuale Spalteffizienzen angegeben.

Die Auswertung am Phosphor-Imager erbrachte für die verschiedenen CSFV-Stämme unterschiedliche Spalteffizienzen (Abb. 4).

Beim Vergleich der für die CSFV-Stämme ermittelten Werte mit für Mutanten des BVDV Stammes Oregon erhaltenen Daten lässt sich erkennen, dass nicht ausschließlich die Menge an exprimiertem NS3 maßgeblich für die Ausbildung des zp Phänotyps sein kann. Oregon Mutanten mit einer Spalteffizienz von rund 60% und darüber zeigten in infizierten Zellen einen ZPE (Kümmerer and Meyers 2000). Der CSFV-Stamm Brescia zeigt eine Prozessierungseffizienz von fast 67 %, ist aber eindeutig nicht zytopathogen. Ferner muss festgehalten werden, dass Oregon-Mutanten mit NS2/3-Spalteffizienzen von weniger als 55 % nicht lebensfähig sind, während Viren der klassischen Schweinepest mit vergleichbaren oder sogar geringeren Spalteffizienzen replizieren und keine Wachstumsdefizite aufweisen. Damit kann darauf geschlossen werden, dass andere Unterschiede zwischen BVDV und CSFV bzw. den verwendeten Zellen (mit)entscheidend für den Phänotyp sind.

### **3.1.2. Einführung von Mutationen an der NS2/3-Spaltstelle**

#### **3.1.2.1 Gerichtete Mutagenese**

Die NS2/3-Spaltstelle wurde für CSFV noch nicht bestimmt. Für andere Pestiviren, insbesondere BVDV, konnte diese Prozessierungsstelle jedoch identifiziert werden. Die fragliche Region, besonders der Aminoterminus des NS3, ist bei BVDV hoch konserviert. Durch Sequenzvergleiche konnte aufgrund hoher Homologie für Viren der klassischen Schweinepest ein entsprechender Bereich identifiziert werden, der die vermutliche NS2/3-Spaltstelle enthält. Zur Überprüfung, wie sich eine veränderte Spaltstelle auf die Spalteffizienz, den Phänotyp und die Lebensfähigkeit der Viren auswirkt, wurden verschiedene Punktmutationen im Bereich der Spaltstelle NS2/3 des Stammes Alfort eingeführt. Für die Untersuchung der Prozessierung des Nichtstrukturproteins NS2/3 des Stammes Alfort wurde, ausgehend vom vorhandenen cDNA-Klon p1347, der Sequenzabschnitt NT 3945-5560 in den Expressionsvektor pCITE-2a kloniert (Konstrukt pRB03). Die Mutagenesen wurden mittels eines PCR-Verfahrens durchgeführt, bei dem die gewünschte Mutation über komplementäre, die Mutation tragende Primer eingeführt wird. Im Anschluss an diese Reaktion erfolgt die Zugabe von Dpn I, das nur methylierte DNA

schneidet und somit die Ausgangsplasmide zerstört. Die mit dieser Methode hergestellten nichtmethylierten intakten PCR-Produkte wurden nach der Reinigung mit dem „NucleospinExtract-Kit“ für die anschließende Transformation gereinigt. Das Vorhandensein der entsprechenden Mutation wurde durch Testspaltungen und Sequenzierung von gereinigter DNA überprüft.

	...	P <sub>5</sub>	P <sub>4</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>1</sub> '	P <sub>2</sub> '	P <sub>3</sub> '	...							
WT	...	L	E	H	L	G	W	V	L	R	G	P	A	V	C	K	...
M43	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	P	.	.	.	.	.	.
M44	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.
M45	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.
M46	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.
M56	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
M57	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.
M58	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	.	.	.
M59	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.
M60	.	.	.	.	.	.	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	.
M61	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.
M62	.	.	.	.	.	.	.	.	.	P	.	.	.	.	.	.	.
M63	.	.	.	.	.	.	.	.	.	K	.	.	.	.	.	.	.
M64	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.	.	.	.	.	.

**Tab. 1: Zusammenstellung der Punktmutationen an der NS2/3-Spaltstelle des CSFV**

Gezeigt ist in der ersten Zeile ein Ausschnitt aus dem Wildtyp(WT)-Polyprotein des Virus der klassischen Schweinepest im Bereich der vermuteten Spaltstelle des Nichtstrukturprotein NS2/3. P<sub>1</sub> zeigt den C-Terminus des NS2 an, während die Position P<sub>1</sub>' für den N-Terminus des NS3 steht. Die als M43 bis M64 bezeichneten Mutanten enthalten die verschiedenen aufgeführten Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp an den entsprechenden Positionen des Nichtstrukturproteins NS2/3 an.

### 3.1.2.2 Einführung von Mutationen in den CSFV-Klon p1230b

Um Auswirkungen der Punktmutationen auf die Spaltung des NS2/3 testen zu können, wurden die mutierten Sequenzen in das Expressionsplasmid p1230b inseriert. Das Konstrukt p1230b beinhaltet unter Kontrolle des T7-Promotors, die viralen Sequenzen die für das Polyprotein des CSFV Alfort/Tübingen von 3085 bis 9582 kodieren. Die Insertion der die Mutationen beinhaltenden Genfragmente in diesen Vektor erfolgte mit Hilfe der Endonukleasen Bgl II und EcoR I. Die Kontrolle der gelungenen Ligation der mutierten Genabschnitte

erfolgte mittels Kontrollspaltungen und Sequenzierungen von gereinigter DNA. Jeweils 4 µg der das veränderte NS2/3 codierenden Plasmide wurden durch Transfektion in 1 h zuvor mit Vaccinia-MVA/T7 infizierte BHK-Zellen eingebracht. Die Expression der von den Plasmiden kodierten Sequenzen erfolgte mittels der RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7, die nach Infektion von Zellen mit dem rekombinanten Vacciniavirus von diesem kodiert wird (Wyatt, Moss, and Rozenblatt 1995). Damit ist es möglich, definierte Abschnitte des CSFV-Polyproteins zu exprimieren und deren proteolytische Prozessierung zu analysieren (Tautz et al. 1996). Für die Darstellung des mit [<sup>35</sup>S] Methionin / [<sup>35</sup>S] Cystein metabolisch markierten NS3 wurden Zellysate für eine Radioimmunpräzipitation mit dem Serum anti-A3 eingesetzt. Die Analyse der präzipitierten Proteine nach Doucet-SDS-PAGE und Fluorographie ließ aufgrund der Überlagerung der spezifischen Banden mit Hintergrundsignalen keine Berechnung der Spalteffizienzen der verschiedenen Mutanten zu. Modifikationen dieses Verfahrens, z. B. durch längere oder kürzere Inkubationsphasen mit [<sup>35</sup>S] Methionin- / [<sup>35</sup>S] Cystein-Markierungsmedium, brachten keine Verbesserung der Ergebnisse.

### **3.1.2.3 Einführung von Mutationen in den CSFV-Gesamtklon (p1347)**

Die NS2/3 Spalteffizienz und die Auswirkung der Mutationen auf die Replikationsfähigkeit kann auch auf Basis eines Gesamt cDNA Konstruktes analysiert werden. Die die Mutationen tragenden Fragmente wurden mit Hilfe einer Endonukleasespaltung (Bgl II und EcoR I) aus den entsprechenden Hilfskonstrukten ausgeschnitten und in den mit den gleichen Enzymen gespaltenen CSFV-Gesamtklon (p1347) eingeführt. Die erfolgreiche Ligation der veränderten Genabschnitte wurde durch Kontrollspaltung und Sequenzierungen von gereinigter DNA überprüft.

Gereinigte DNA der die Mutationen tragenden Plasmide wurde zur Erzeugung eines authentischen CSFV-3'-Endes mit Xma I linearisiert und als DNA-Matrize für die *in vitro* Transkription eingesetzt. Nach der Transkription mit Hilfe der SP6-RNA-Polymerase wurde der Reaktionsansatz durch Gelfiltration mit Sephadex G-50 gereinigt. Hierdurch wurden freie Nukleotide, die bei der späteren Transfektion stören würden, entfernt. Anschließend wurde die transkribierte RNA noch durch Phenol/Chloroformextraktion und Ethanol-fällung gereinigt. Zur Überprüfung der erfolgreichen *in vitro* Transkription wurden 3 µl

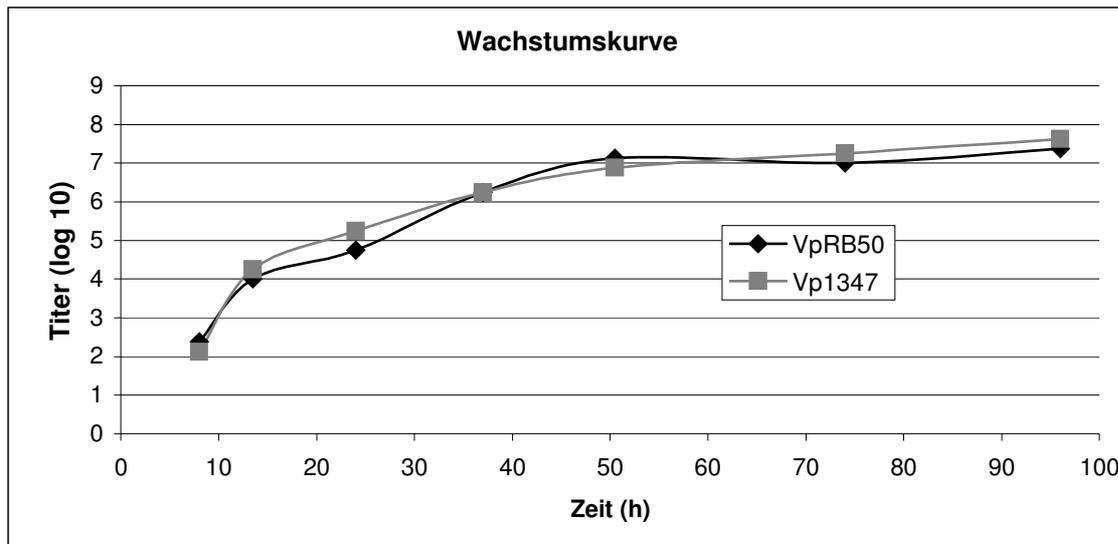
des Transkriptionsansatzes im denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und nach Färbung mit Acridinorange im UV Licht begutachtet. Im Folgenden wurde untersucht, ob die Transfektion *in vitro* transkribierter RNA zur Bildung von infektiösen Viren führen würde. Hierzu wurden 5 µl des Transkriptionsansatzes für die Transfektion von SK6-Zellen eingesetzt. Die Transfektion erfolgte nach der DEAE-Dextran-Methode, bei der durch Bindung der RNA an die DEAE-Gruppen des hochpolymeren Dextranträgers die Aufnahme der Nukleinsäure in die Zelle ermöglicht wird. 72 h nach der Transfektion wurden die Zellen durch Behandlung mit Trypsin aus der Kulturschale abgelöst und im geeigneten Verhältnis weiter passagiert. Eine erneute Passage erfolgte weitere drei Tage später. Mittels indirekter Immunfluoreszenz wurde 72 h nach Transfektion und auch nach dem Umsetzen der transfizierten Zellen sowie nach fünfmaliger Passage untersucht, ob das virusspezifische Protein E2 (gp55) in der Zelle gebildet worden war. Als Positivkontrolle diente RNA, die *in vitro* vom nicht mutierten Ausgangsplasmid p1347 transkribiert worden war. Neben der Positivkontrolle konnte in vier weiteren Ansätzen das E2 in transfizierten Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz (IF) nachgewiesen werden. Es handelte sich hierbei um Kulturzellen, die mit RNA der Mutanten M43, M56, M57 und M58 transfiziert worden waren.

Um zu zeigen, dass genetisch veränderte Viren erzeugt wurden, sollte die Sequenzveränderung im Genom der rekombinanten Viren nachgewiesen werden. Dazu wurden Zellen mit den erhaltenen Viren infiziert. Nach drei Tagen erfolgte die Isolierung von Gesamzell-RNA. Ausgehend von dieser isolierten RNA wurde eine RT-PCR mit den Oligonukleotiden „csfv4881.seq“ und „csfv5700.rev“ durchgeführt. Als Vergleich diente RNA der Positivkontrolle. Nach Auftrennung der RT-PCR-Produkte im Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel konnten DNA-Fragmente mit der erwarteten Größe von 809 bp nachgewiesen werden. Eine PCR-Kontrolle, die ohne Zugabe von viraler RNA durchgeführt wurde, lieferte kein Amplifikationsprodukt.

Um die Anwesenheit der eingeführten Mutationen zu überprüfen, wurden Aliquots der erhaltenen DNA-Fragmente sequenziert. Diese Analyse zeigte jedoch, dass es sich bei den überprüften vermeintlichen Mutanten um Revertanten handelte. Somit trug keines der überprüften Viren die Mutation stabil.

### 3.1.3 Austausch der Promotorregion im p1347

Da mit den Konstrukten auf Basis des p1230b keine Bestimmung der Spalteffizienz möglich war, wurde die Promotorregion des Konstrukts p1347 so verändert, dass die Gesamtklonkonstrukte mittels Vaccinia-MVA/T7 exprimiert werden konnten. Hierzu wurde eine Polymerase-Kettenreaktion mit den Oligonukleotiden „T7pest1.seq“ und „csfv450.rev“ durchgeführt. Der Primer „T7pest1.seq“ enthält die Erkennungssequenz der Endonuklease Not I, die T7-Promotorsequenz und den Anfang des konservierten 5'-nicht-codierenden Bereichs der Pestiviren. Das 450 bp große Fragment, das mit Hilfe dieser Primer amplifiziert worden ist, wurde Not I und Xho I gespalten und in den ebenso behandelten Vektor p1347 integriert. Das erhaltene Konstrukt (pRB50) wurde ebenso wie p1347 mit Xma I geschnitten und wie bereits zuvor beschrieben für eine ivTs-Reaktion eingesetzt, mit der T7-RNA-Polymerase im Falle des pRB50 und der SP6-RNA-Polymerase für das Konstrukt p1347. 5 µl des Transkriptionsansatzes wurden für die Transfektion nach der DEAE-Dextran-Methode von SK6-Zellen eingesetzt. Nach 72 h und nach fünfmaligem Passagieren wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz überprüft, ob das virusspezifische Glykoprotein E2 (gp55) in den Zellen gebildet worden war. Zur Kontrolle, ob ausser dem erwünschten Austausch der SP6-Promotorregion weitere, das Wachstum der Viren beeinflussende Veränderungen im Plasmid stattgefunden haben, wurde mit einem Aliquot der fünften Passage beider Anzuchten eine Wachstumskurve ermittelt. Hierzu wurden SK6-Zellen mit einer  $moi$  von 0,01 infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet. Das Ergebnis dieses Versuchs ergab keine signifikanten Wachstumsunterschiede. Beide Viren entsprechen sich im Wachstumsverhalten, wie erwartet, da nur der Promotor des Plasmids ausgetauscht wurde woraus kein Einfluss auf das Verhalten der Viren resultieren sollte.



**Abb. 5: Wachstumskurve**

Darstellung der Wachstumskurve der aus den Plasmiden 1347 und pRB50 über ivTs und DEAE-Transfektion generierten CSF-Viren.

### 3.1.4 Einführung von Mutationen in den CSFV-Gesamtklon (pRB50)

Da die ersten Versuche zur Ermittlung der Spalteffizienz der im Bereich der Spaltstelle NS2/3 veränderten Konstrukte fehlgeschlagen waren, wurden die unter 3.1.2.1 beschriebenen Fragmente in den unter der Kontrolle des T7-Promotors stehenden CSFV-Gesamtklon (pRB50) inseriert.

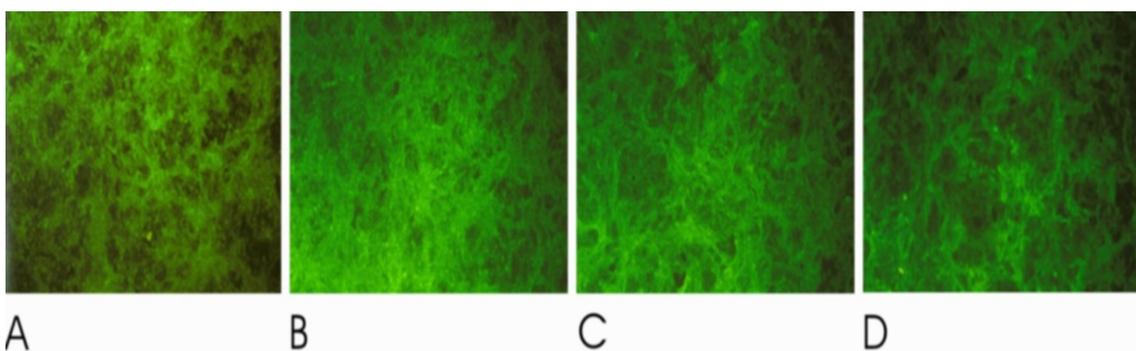
#### 3.1.4.1 Transiente Expression mutierter CSFV-Klone

Die Plasmide auf Basis des pRB50 mit den mutierten Genabschnitten der NS2/3-Spaltstelle unter Kontrolle des Promotors der T7-RNA-Polymerase wurden durch Transfektion in mit Vaccinia-MVA/T7 infizierte BHK-Zellen eingeschleust. Die Fremdproteine wurden entsprechend dem Standard-Protokoll für die Radioimmunpräzipitation aufgearbeitet, mit dem anti-A3 Serum gefällt und in einer 12 %igen SDS-PAGE nach Doucet aufgetrennt. Die Fluorographie ließ auch hier aufgrund der Überlagerung unspezifischer und spezifischer Banden keine Berechnung der Spalteffizienzen der verschiedenen Mutanten zu. Modifikationen dieses Verfahrens, zum Beispiel durch längere oder kürzere Inkubationsphasen mit [<sup>35</sup>S] Methionin- / [<sup>35</sup>S] Cystein-Markierungsmedium brachten keine Verbesserung der Ergebnisse.

### 3.1.4.2 Eigenschaften *in vitro* transkribierter RNA der CSFV-Mutanten auf

#### Basis des pRB50

Gereinigte DNA der die Mutation tragenden Plasmide wurde zur Erzeugung eines authentischen CSFV-3'-Endes mit Xma I linearisiert und als DNA-Matrize für die *in vitro* Transkription eingesetzt. Nach Transkription mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase wurden die Reaktionsansätze wie unter 3.1.2.3 weiter behandelt und 5 µl des Transkriptionsansatzes für die Transfektion von SK6-Zellen eingesetzt. Die Transfektion erfolgte ebenfalls nach der DEAE-Dextran-Methode. 72 h nach der Transfektion wurden die Zellen durch Behandlung mit Trypsin aus der Kulturschale abgelöst und in geeigneten Verdünnungen weiter passagiert. Eine erneute Passage erfolgte weitere drei Tage später. Mittels indirekter Immunfluoreszenz wurde 72 h nach Transfektion und auch nach dem Umsetzen der transfizierten Zellen sowie nach fünfmaliger Passage untersucht, ob das virusspezifische Protein E2 (gp55) in den Zellen gebildet worden war. Als Positivkontrolle diente synthetische RNA mit der Sequenz des CSFV Alfort Wildtyps, die *in vitro* transkribiert wurde. Positive Fluoreszenzsignale wurden ausser bei der Positivkontrolle auch bei den Mutanten M45, M46 und M64 erhalten. In keinem Fall zeigten sich Hinweise auf eine Zerstörung des Zellrasens durch die Infektion (Abb. 6). Die gesamten Ergebnisse der Transfektionsversuche sind in Tabelle 2 zusammengefasst.



**Abb. 6: CSFV-NS2/3-Mutanten**

Um die Lebensfähigkeit der NS2/3-Mutanten zu untersuchen, wurden SK6-Zellen mit einer m.o.i. von 1 infiziert und die Entwicklung beobachtet. Nach der Fixierung des Zellrasens mit Methanol / Aceton (1:1) bei -20 °C wurden die infizierten Zellen mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper inkubiert („α-a18“). Nach der Inkubation mit diesem 1. Ak für 1 h bei 37 °C erfolgte die Behandlung mit dem FITC-markierten 2. Antikörper, ebenfalls für 1 h bei 37 °C.

A: SK6-Zellen mit CSFV-WT,

B: SK6-Zellen mit CSFV-Mut 45,

C: SK6-Zellen mit CSFV-Mut 46,

D: SK6-Zellen mit CSFV-Mut 64,

Mutation	AS-Austausch	Position	Lebensfähigkeit	Stabilität nach 5 Passagen
WT			+	+
43	G-> P	P1´	+	rev.
44	G-> D	P1´	-	
45	G -> S	P1´	+	+
46	G -> A	P1´	+	+
56	W -> A	P4	+	rev.
57	I -> R	P3	+	rev.
58	L -> E	P2	+	rev.
59	R -> A	P1	-	
60	R -> D	P1	-	
61	R -> I	P1	-	
62	R -> P	P1	+	rev.
63	R -> K	P1	+	rev.
64	R -> H	P1	+	+

**Tab. 2: Lebensfähigkeit der CSFV-Mutanten**

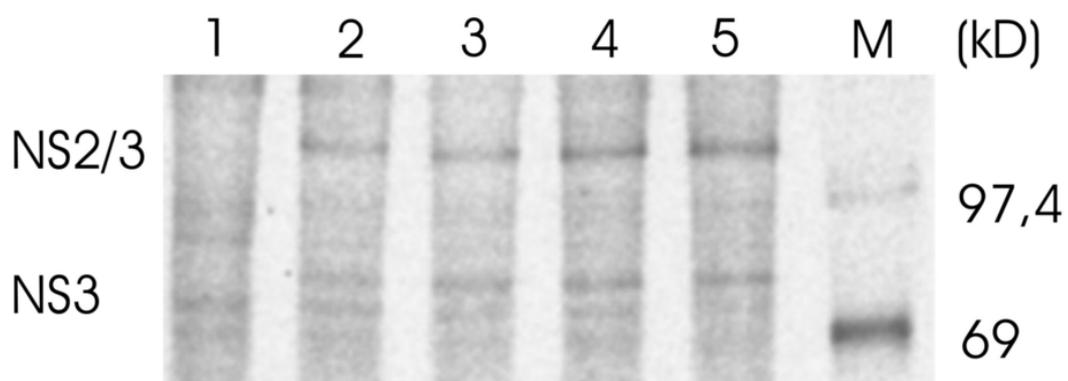
Aufgelistet sind die verschiedenen Mutationen, die im Bereich der NS2/3-Spaltstelle des CSFV-Stammes Alfort vorgenommen wurden, und ihre entsprechende Position. Spalte vier zeigt durch ein „+“ markiert diejenigen Konstrukte, die sowohl in der ersten als auch fünften Passage in der indirekten Immunfluoreszenz positiv reagierten. In Spalte fünf sind die zum Wildtyp revertierten Konstrukte (rev.) und die stabilen, auch nach fünf Passagen die Mutation tragenden CSF-Viren („+“) gezeigt.

Molekularbiologische Analysen der mutierten CSF-Viren zeigten, dass nur drei der insgesamt neun lebensfähigen Viren nach fünf Passagen die eingefügte Veränderung noch im viralen Genom enthalten hatten. Im Wachstumsvergleich über den Zeitraum von 72 h zeigte sich zwischen den stabilen Mutanten und dem Wildtyp kein signifikanter Unterschied. Nach der Infektion mit einer m.o.i. von 0,01 erreichten die Titer der überprüften Mutanten und des Wildtyps äquivalente Werte.

Virus	CSFV-WT	Mut 45	Mut 46	Mut64
KID50 nach 72 h	$10^{7,19}$	$10^{7,12}$	$10^{7,25}$	$10^{7,00}$

### 3.1.4.3 Spalteffizienzen der verschiedenen CSFV-Mutanten

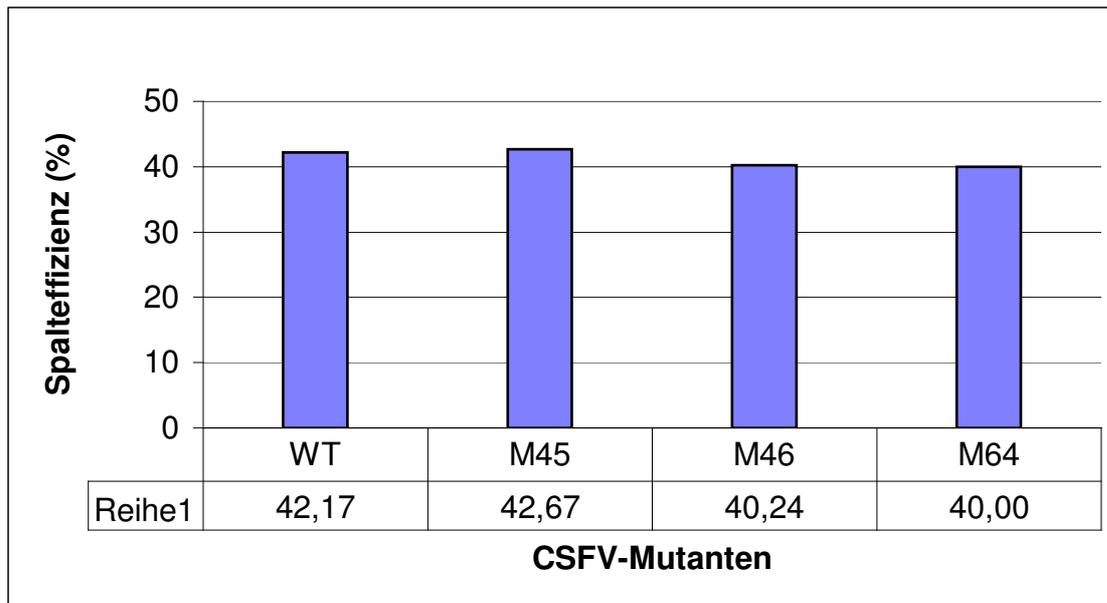
Nachdem die Ermittlung der Spalteffizienz nach transienter Expression der entsprechenden Plasmide mit Hilfe der Vaccinia-Virus MVA/T7 Methode zu keinem Ergebnis geführt hatte, wurde versucht die Spaltraten des NS2/3-Proteins der lebensfähigen mutierten Viren nach Infektion zu bestimmen. Um die Proteine der CSFV-Mutanten mit denen des Alfort Wildtyps vergleichen zu können, wurden SK6-Zellen mit den unter 3.1.4.2 beschriebenen Viren mit einer m.o.i von 1 infiziert. Nach 24 h erfolgte die metabolische Markierung mit [<sup>35</sup>S] Methionin / [<sup>35</sup>S] Cystein. Die Zellextrakte wurden für die Präzipitation mit dem Serum anti-A3 verwendet. Die Analyse der Präzipitate mittels SDS-PAGE (Abb. 7) demonstrierte, dass die von den Mutanten gebildeten Proteine NS2/3 und NS3 mit den entsprechenden Proteinen des CSFV-Wildtyps komigrierten. Die weitere Auswertung der Daten am Phosphor-Imager zeigte eine annähernd äquivalente Spaltung des Nichtstrukturproteins NS2/3 für alle getesteten Varianten.



**Abb. 7: Radioimmunpräzipitation zur NS2/3-Spaltung der CSFV-NS2/3-Mutanten**

Nach Infektion mit den verschiedenen Viren und metabolischer Markierung mit [<sup>35</sup>S] Methionin / [<sup>35</sup>S] Cystein wurden Zellextrakte gewonnen und für die Immunpräzipitation eingesetzt. Die Präzipitation erfolgte mit dem anti-A3-Serum. Die Präzipitate wurden durch SDS-PAGE (12 % PAA, Gelsystem nach Doucet/Trifaro) unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Die Zahlen am rechten Rand geben die Molekulargewichte von Standardproteinen in kD an. Die Quantifizierung der NS2/3-Spaltung der von den einzelnen Viren exprimierten NS2/3- und NS3-Proteine ist in Abb. 8 zu sehen.

Spur 1: nicht infizierte Zellen,      Spur 2: Stamm Alfort WT,      Spur 3: Mut 45,  
 Spur 4: Mut 46,                      Spur 5: Mut 64,                      M: Größenmarker



**Abb. 8: Spalteffizienzen der CSFV-Mutanten**

Abgetragen sind die Spalteffizienzen der verschiedenen NS2/3-Mutanten. Für die Ermittlung der angegebenen Werte wurden für alle Viren drei unabhängige Experimente durchgeführt. Die Zellextrakte wurden jeweils mit dem anti-A3-Serum präzipitiert und die Präzipitate mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Mit Hilfe des Phosphor-Imagers wurde die Stärke der NS2/3- und NS3-Signale ermittelt. Unter Berücksichtigung der Zahl der Methionine und Cysteine in den jeweiligen NS2/3- bzw. NS3-Proteinen wurde der prozentuale Anteil des NS3 an der Gesamtmenge von NS3 / NS2/3 berechnet. Die für jede Mutante aus den unabhängigen Experimenten erhaltenen drei Werte wurden gemittelt und hier als prozentuale Spalteffizienzen angegeben.

Die bisher untersuchten, lebensfähigen CSFV-Mutanten ließen sich in zwei Gruppen einordnen, zum einen in die Gruppe der Revertanten und zum anderen in die Gruppe der Viren, die die Mutation stabil tragen. Bei den neun nachgewiesenen Revertanten scheint der Eingriff in die Proteinstruktur und damit die Funktion dermaßen gravierend zu sein, dass eine effiziente Replikation nicht möglich und somit eine „Reparatur“ notwendig ist. Beim Vergleich des Wildtyps mit den stabilen Mutanten erkennt man, dass sowohl das ursprüngliche Virus als auch die veränderten Viren eine Spalteffizienz von jeweils etwa 40 % aufweisen.

Lebensfähig ohne Reversion war die Mutante M64 mit dem Austausch des Arginin gegen Histidin als letzte AS des NS2-Proteins. Beide Aminosäuren gehören zwar in die Gruppe der basischen Aminosäuren, doch ist das Histidinmolekül kleiner und weist einen heterozyklischen Rest auf. Trotz dieses Unterschieds scheint die Struktur und die Funktion des Proteins dadurch nicht wesentlich beeinträchtigt zu werden. Die beiden anderen lebensfähigen Mutanten trugen die Bezeichnung M45 und M46. Substituiert wurde hier die

erste Aminosäure des NS3-Proteins Glycin gegen Serin bzw. Alanin. Bei beiden Substituenten handelt es sich wie beim ursprünglichen Glycin auch um kleine Aminosäuren ähnlichen Charakters, obwohl Serin durch seinen Hydroxylrest polarer ist als Alanin.

### **3.2 NS2/3-Spaltung bei BVDV Oregon**

Bei dem zytopathogenen (zp) BVDV-Stamm Oregon handelt es sich um einen „Laborstamm“, der in den 1960er Jahren isoliert und seither in Zellkultur vermehrt wurde. Ob das Virus ursprünglich aus einem an „mucosal disease“ (MD) erkrankten Tier stammt, ist nicht bekannt. Ein nicht zytopathogener (nzp) Viruspartner ist nicht verfügbar.

Zytopathogene BVD-Viren unterscheiden sich in der späteren Phase der Infektion von nicht zytopathogenen BVD-Viren durch die Expression des 80 kD-Proteins NS3. Wenige Stunden nach dem Eindringen des Virus in die Zelle wird sowohl von zp wie auch von nzp BVDV NS3 exprimiert. Diese Prozessierung wird die im NS2 lokalisierte Autoprotease bewerkstelligt (Lackner et al. 2004). Im Verlauf der Infektion wird die NS3 Expression bei nzp Viren herunterreguliert, während die Menge dieses Proteins bei zp Viren weiter ansteigt. NS3 kann somit im späten Verlauf der Infektion als Markerprotein für zp BVD-Viren angesehen werden. NS2/3 wird hingegen konstitutiv sowohl in mit zp BVDV infizierten Zellen als auch in mit nzp BVDV infizierten Zellen exprimiert.

Um die Prozessierung des Nichtstrukturproteins NS2/3 des Stammes Oregon zu untersuchen, wurden transiente Expressionsstudien im T7-Vacciniavirus-System durchgeführt (siehe 3.1.2.2).

#### **3.2.1 Herstellung eines T7-Expressionskonstruktes**

Für die Untersuchung der NS2/3-Prozessierung des Stammes Oregon wurde ausgehend vom vorhandenen Oregon-Gesamtklon (Kümmerer, 1997) der Sequenzabschnitt von NT 3725-8050 in den Expressionsvektor pCITE-2a kloniert, so dass das Plasmid p165 entstand (Kümmerer, 1997). Das zu exprimierende Protein beginnt im carboxyterminalen Drittel von p7 und endet im

NS4B. Die zu exprimierenden Gene stehen unter der Kontrolle des Promotors für die T7-RNA-Polymerase.

Der zur Mutagenese verwendete Klon enthielt im Vektor pBluescript die Nukleotide 4970- 5335 (BspD I/Sal I). Die Mutagenesen wurden mittels PCR durchgeführt, bei der die gewünschte Mutation über komplementäre, die Mutation tragende Primer eingeführt wurde. Das Vorhandensein der entsprechenden Mutation wurde durch Testspaltungen bzw. Sequenzierung von gereinigter DNA überprüft. Die mutierten Genfragmente wurden aus den erhaltenen Plasmiden mittels BspD I / Sal I-Spaltung herausgelöst und in den Expressionsvektor p165 ligiert. Nach molekularbiologischer Überprüfung der Konstrukte wurden jeweils 4 µg der das veränderte NS2/3 codierenden Plasmide in 1 h zuvor mit Vaccinia-MVA/T7 infizierte BHK-Zellen eingebracht.

	...	P <sub>5</sub>	P <sub>4</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>1</sub> '	P <sub>2</sub> '	P <sub>3</sub> '	...							
WT	...	L	E	H	L	G	W	I	L	R	G	P	A	V	C	K	...
M43	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	P	.	.	.	.	.	.
M44	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.
M45	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.
M46	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.
M56	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
M57	.	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
M58	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	.	.	.	.
M59	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.
M60	.	.	.	.	.	.	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	.
M61	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.
M62	.	.	.	.	.	.	.	.	.	P	.	.	.	.	.	.	.

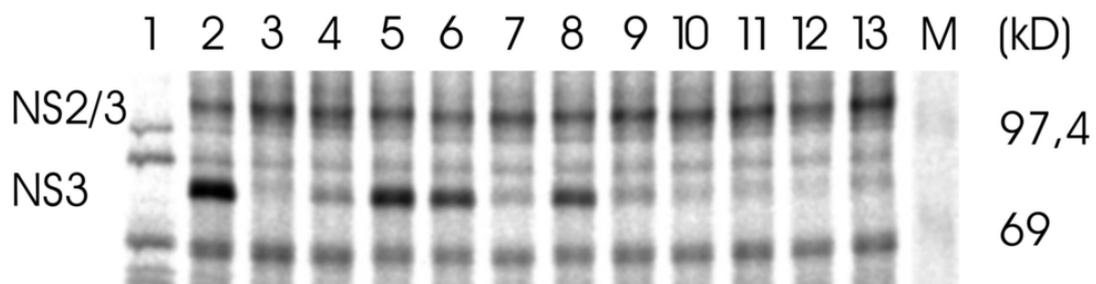
**Tab. 3: Position der Punktmutationen bei BVDV-Oregon**

Zeile eins zeigt einen Ausschnitt aus dem Wildtyp(WT)-Polyprotein des BVD-Virus, Stamm Oregon, im Bereich der Spaltstelle des Nichtstrukturprotein NS2/3. P<sub>1</sub> zeigt den C-Terminus des NS2 an, während die Position P<sub>1</sub>' für den N-Terminus des NS3 steht. Die mit M43 bis M64 bezeichneten Sequenzen geben die verschiedenen Veränderungen im Vergleich zur Wildtypsequenz an den entsprechenden Positionen des Nichtstrukturproteins NS2/3 an.

### 3.2.2 Transiente Vaccinia-Expression mutierter Oregon-Klone

Für die Darstellung der mit [<sup>35</sup>S] Methionin / [<sup>35</sup>S] Cystein metabolisch markierten NS2/3-, NS2- und NS3-Proteine wurden die BHK-Zelllysate für Radioimmunpräzitationen mit den Seren anti-A3 und anti-Pep6 eingesetzt. Das anti-Pep6-Serum, dient zum Nachweis des NS2, und ist gegen die Aminosäuren 1571-1586 des BVDV-CP7-Polyproteins gerichtet (Tautz et al. 1996). Das anti-A3 Serum ist gegen ein bakterielles Fusionsprotein gerichtet, welches die AS 1750-2349 des Polyproteins von CSFV Alfort umfasst und mit dem NS3 und NS2/3 verschiedener Pestiviren reagiert (Thiel et al. 1991).

Die Analyse der präzipitierten Proteine nach Doucet- bzw. Jagow-SDS-PAGE und Fluorographie schloss sich an. Zur Darstellung des NS3 wurde das Verfahren nach Doucet gewählt, da es größere Proteine besser auftrennt. Das 80 kD große Protein wird im Wildtyp und den Mutanten unterschiedlich stark exprimiert. Die ungleiche Spaltung ist am heterogenen Bandenmuster zu erkennen. Man findet neben einer hohen Spaltrate z.B. beim Wildtyp (Spur 2) und bei Mut45 (Spur 5) auch Muster, die auf schwache bzw. aberrante Prozessierungen des Zielproteins hindeuten [Mut44 (Spur 4) und Mut62 (Spur 13)].

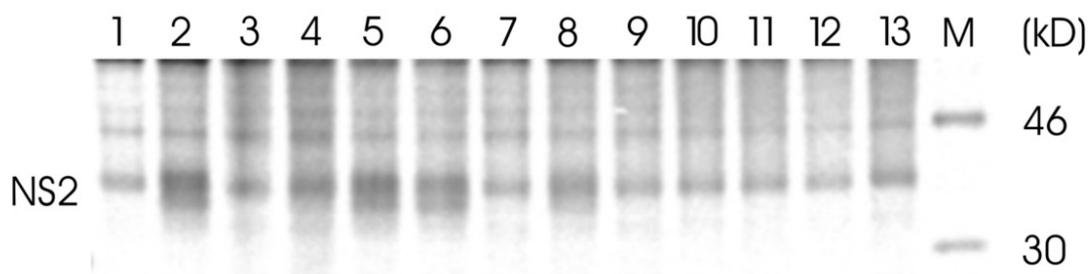


**Abb. 9: Radioimmunpräzitation zur NS2/3-Spaltung von Mutanten des BVD-Stammes Oregon.**

Nach metabolischer Markierung mit [<sup>35</sup>S] Methionin / [<sup>35</sup>S] Cystein wurden Zellextrakte gewonnen und für die Immunpräzitation eingesetzt. Die Präzitation erfolgte mit dem anti-A3-Serum. Die Präzitate wurden durch SDS-PAGE (12% PAA, Gelsystem nach Doucet / Trifaro) unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Die Zahlen am rechten Rand geben die Molekulargewichte von Standardproteinen in kD an. Die Quantifizierung der NS2/3-Spaltung der von den einzelnen Mutanten exprimierten NS2/3- und NS3-Proteine ist in Abb. 11 zu sehen.

Spur 1: Vaccinia-Kontrolle,      Spur 2: WT Stamm Oregon,      Spur 3: Mut 43,  
 Spur 4: Mut 44,                      Spur 5: Mut 45,                      Spur 6: Mut 46,  
 Spur 7: Mut 56,                      Spur 8: Mut 57,                      Spur 9: Mut 58,  
 Spur 10: Mut 59,                      Spur 11: Mut 60,                      Spur 12: Mut 61,  
 Spur 13: Mut 62,                      M: Größenmarker

Als interne Kontrolle des im Doucet-Gel nachgewiesenen NS3 wurde simultan in einem SDS-PAGE nach Jagow das NS2, welches mit dem Antikörper „Pep6“ präzipitiert wurde, als weiteres Spaltprodukt des NS2/3 nachgewiesen. Die Zusammensetzung des PA-Gels nach Jagow ermöglicht die bessere Auftrennung kleinerer Proteine, zu denen das NS2 mit seinen ca. 42 kD gehört. In Fällen starker NS2/3-Prozessierung erkennt man schwach das für das NS2 typische Bandenmuster, das sich durch die breite Bande im Bereich von ca. 40 - 42 kD auszeichnet [z.B. beim Wildtyp (Spur 3) und bei Mut45 (Spur 6)]. Diese Bandenverbreiterung ist typisch für das NS2 des BVDV Oregon; die Ursache für dieses besondere Laufverhalten des Proteins ist allerdings bisher nicht geklärt (Kümmerer, Stoll, and Meyers 1998). Bei einer nur sehr geringen oder aberranten Spaltung hingegen ist aufgrund des Hintergrunds nur sehr schwer eine für das NS2 spezifische Bande auszumachen [z.B. Mut44 (Spur 4) oder Mut62 (Spur 13)].



**Abb. 10: Radioimmunpräzipitation zur NS2/3-Spaltung von Mutanten des BVD-Stammes Oregon.**

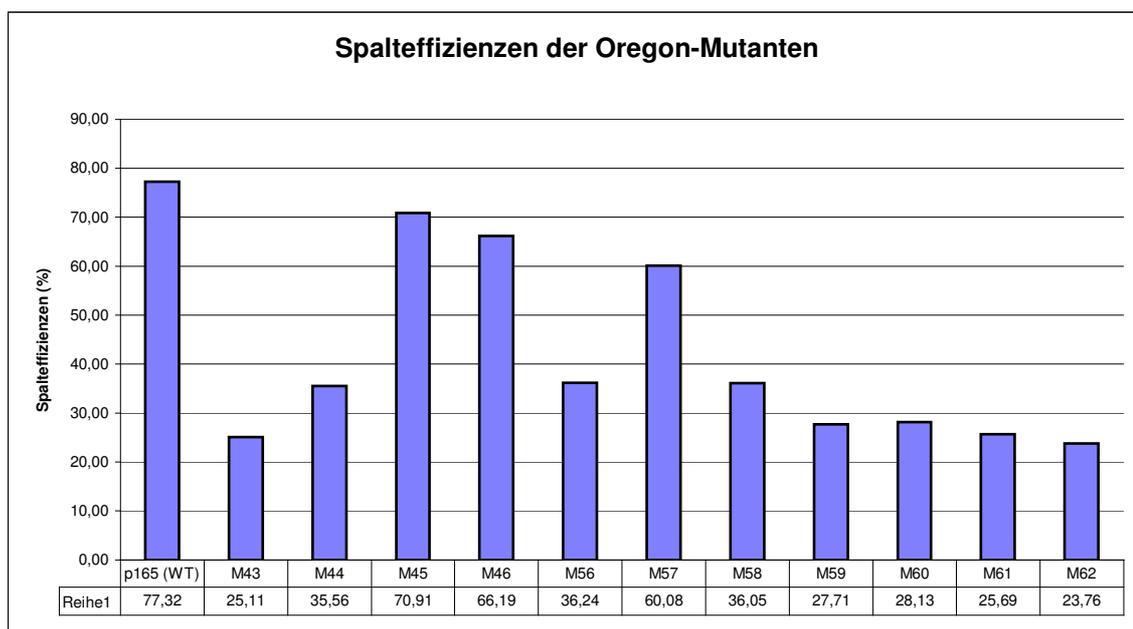
Nach metabolischer Markierung mit [<sup>35</sup>S] Methionin / [<sup>35</sup>S] Cystein wurden die Zellextrakte transient transfizierter Zellen für die Immunpräzipitation eingesetzt. Die Präzipitation erfolgte mit dem anti-Pep6-Serum. Die Präzipitate wurden durch SDS-PAGE (10% PAA, Gelsystem nach Schägger / Jagow) unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Die Zahlen am rechten Rand geben die Molekulargewichte von Standardproteinen in kD an.

Spur 1: Vaccinia-Kontrolle,	Spur 2: WT Stamm Oregon,	Spur 3: Mut 43,
Spur 4: Mut 44,	Spur 5: Mut 45,	Spur 6: Mut 46,
Spur 7: Mut 56,	Spur 8: Mut 57,	Spur 9: Mut 58,
Spur 10: Mut 59,	Spur 11: Mut 60,	Spur 12: Mut 61,
Spur 13: Mut 62,	M: Größenmarker	

### 3.2.3 Spalteffizienzen der Mutanten im Expressionsklon p165

Die Analyse der präzipitierten Proteine nach Doucet-SDS-PAGE und Fluorographie zeigte, dass NS2/3 in den verschiedenen Mutanten unterschiedlich stark gespalten wurde. Die Auswertung der Doucet Gele am Phosphoimager mit der Software Tina 2.0 erlaubt, in Abhängigkeit von den im NS2/3 vorhandenen Cysteine und Methionine, die quantitative Bestimmung der

Spalteffizienzen. In der graphischen Darstellung korreliert eine starke Prozessierung mit einer hohen Säule in der Grafik (Abb. 11).



**Abb. 11: Spalteffizienzen der verschiedenen Oregon-NS2/3-Mutanten**

Zur Ermittlung der abgetragenen Werte wurden für alle Plasmide drei unabhängige Experimente durchgeführt. Die Zellextrakte wurden jeweils mit dem anti-A3-Serum präzipitiert und die Präzipitate mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Mit Hilfe des Phosphor-Imagers wurde die Stärke der NS2/3- und NS3-Signale ermittelt. Unter Berücksichtigung der Zahl der Methionine und Cysteine in den jeweiligen NS2/3- bzw. NS3-Proteinen wurde der prozentuale Anteil des NS3 an der Gesamtmenge aus NS3 und NS2/3 berechnet.

Von den elf untersuchten Mutanten wiesen acht schwache bzw. aberrante Spalteffizienzen auf (M43, M44, M56, M58, M59, M60, M61, M62). Dies ist als Hinweis darauf zu werten, dass die jeweilige Mutation an der Spaltstelle die Prozessierung signifikant behindert.

Weitere drei Mutanten zeigten Spaltraten von bis zu 70 %, erreichten jedoch nicht die Effizienz des Wildtyps. Diese Mutanten trugen die Bezeichnungen M45, M46 sowie M57; die Austausche betrafen die Positionen P3 und P1'.

Der Austausch des hydrophoben Isoleucins an der Position P3 des NS2 gegen das basische Arginin (M57) hat verglichen mit der Spaltrate des Wildtyps eine moderate Reduktion der Spalteffizienz zur Folge. Es ist erstaunlich, dass dieser Austausch, der sowohl den Wechsel von einer hydrophoben hin zu einer hydrophilen, basischen Aminosäure, wie auch eine Größenzunahme bedeutet, einen so geringen Einfluss auf die Spaltfähigkeit des NS2/3 hat. Das Ergebnis weist darauf hin, dass die AS an P3 keine große Bedeutung für die Spaltung hat.

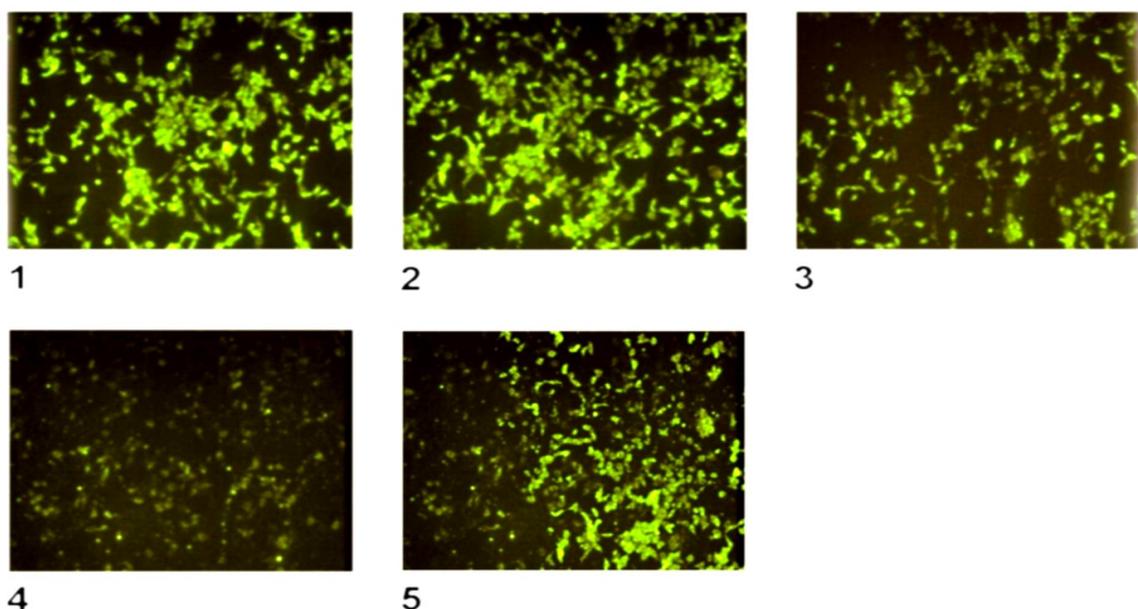
Die beiden anderen Mutanten mit hoher Spaltrate trugen die Bezeichnung M45 und M46. Substituiert wurde hier die erste Aminosäure des NS3-Proteins Glycin gegen Serin bzw. Alanin. Bei beiden Substituenten handelt es sich wie beim ursprünglichen Glycin um kleine Aminosäuren ähnlichen Charakters, obwohl Serin durch seinen Hydroxylrest polarer ist als Alanin. Die Mutante M45 konnte sowohl bei CSFV Alfort wie auch bei BVDV Oregon charakterisiert werden. Ein direkter Vergleich ist jedoch nur bedingt möglich, da es sich bei der auf BVDV Oregon basierenden Mutante um ein eigens erzeugtes Expressionskonstrukt handelt, während beim CSFV Alfort die Mutation im Kontext eines lebensfähigen Virus analysiert wurde. In beiden Systemen spalten die Mutanten annähernd äquivalent zu ihrem Wildtyp. Dies bedeutet, dass die eingeführte Veränderung die Spalteffizienz kaum beeinträchtigt. Die strikte Konservierung des Glycins am Aminoterminus des NS3 bei beinahe allen bekannten BVDV- und CSFV-Stämmen ist damit offensichtlich nicht durch die Fähigkeit zur NS2/3-Prozessierung bedingt.

### **3.2.4 Lebensfähigkeit der Mutanten**

Zur Ermittlung der Lebensfähigkeit der Mutanten wurde eine Auswahl der unter 3.2.1 beschriebenen, die Mutationen tragenden Fragmente in den Oregon-Gesamtklon (Kümmerer and Meyers 2000) inseriert. Diese Auswahl, die anhand der unter 3.2.3 dargestellten Ergebnisse getroffen wurde, beinhaltete sowohl stark wie auch schwach spaltende Varianten. Im Einzelnen handelte es sich um die Mutanten M43, M44, M45, M56, M57, M58, M59 und M61. Die Klonierung erfolgte über die Schnittstellen BspD I und Sal I. Einer *in vitro* Transkription mit der T7-RNA-Polymerase folgte eine DEAE-Transfektion der erhaltenen RNA in MDBK-Zellen. Nach ca. 72 h konnte in einigen Gewebekulturschalen ein zytopathogener Effekt beobachtet werden. Zu diesem Zeitpunkt und zudem nach fünfmaliger Passage wurde die Infektion der Zellkultur mittels indirekter Immunfluoreszenz beurteilt. Hierbei konnte beobachtet werden, dass sich nur vier der acht überprüften Mutanten in der Zellkultur vermehrten und die Zellen lysierten (Abb. 12). Vier der potentiellen Mutanten (M43, M44, M59 und M61) induzierten in den Anzuchtzellen keine phänotypischen Veränderungen, ließen sich aber auch nicht mittels der IF nachweisen (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis zeigt, dass Viren mit diesen Veränderungen nicht vermehrungsfähig sind und die eingefügten Änderungen

die Viren so stark schädigen, dass eine Reparatur durch Reversion oder Pseudoreversion nicht möglich ist. Dies deutet darauf hin, dass die Mutanten nicht fähig sind, in nennenswertem Maße RNA zu replizieren.

Es bleibt festzuhalten, dass eine Änderung des Phänotyps zum nzp Virus durch Reduktion der Spalteffizienz offensichtlich nicht auftritt. Bei den Mutanten M45, M56, M57 und M 58 trat der ZPE verglichen mit dem Wildtyp in der ersten Passage nach der Transfektion um einen Tag verzögert auf. In den folgenden Zyklen konnte optisch keine Divergenz mehr festgestellt werden. Zu gleichen Zeitpunkten post transfectionem wurde auch RNA geerntet. Die Sequenzierung der über eine RT-PCR erhaltenen cDNA bestätigte den Verdacht, dass jedes der überprüften mutierten Viren revertiert hatte. Alle überprüften Revertanten wiesen wieder die Wildtypsequenz auf. BVD-Viren vom Stamm Oregon scheinen mit veränderten Aminosäuresequenzen an der NS2/3-Spaltstelle nicht lebensfähig zu sein. Für CSFV Alfort konnten dagegen wie oben beschrieben drei stabile Mutanten nachgewiesen werden, von denen zwei den Aminoterminus des NS3 betrafen.



**Abb. 12: Oregon-NS2/3-Mutanten**

Um die Lebensfähigkeit der potentiellen NS2/3-Mutanten zu untersuchen, wurden MDBK-Zellen mit einer m.o.i. von 1 infiziert und die Entwicklung beobachtet. Nach der Fixierung des Zellrasens mit Methanol / Aceton (1:1) bei -20 °C wurden die infizierten Zellen mit einem spezifischen monoklonalen Antikörpermix inkubiert („BVD-Mix“). Nach der Inkubation mit dem 1. Ak für 1 h bei 37 °C erfolgte die Behandlung mit dem FITC-markierten 2. Antikörper, ebenfalls für 1 h bei 37 °C. Man erkennt den ZPE im Zellrasen in allen mit den potentiellen NS2/3-Mutanten infizierten Kavernen.

1: MDBK-Zellen mit Oregon-WT, 2: MDBK-Zellen mit Oregon-Mut 45,  
3: MDBK-Zellen mit Oregon Mut 56, 4: MDBK-Zellen mit Oregon-Mut 57,  
5: MDBK-Zellen mit Oregon-Mut 58

### **3.3 Einführung einer Mutation im NS4B**

In Abhängigkeit ihres Effekts in der Zellkultur werden Isolate der BVD-Viren in die zwei Biotypen zp und nzp untergliedert. Die zp Viren unterscheiden sich von den nzp Biotypen durch die Expression des Nichtstrukturproteins NS3 in der späten Phase der Infektion. Der Mechanismus der Induktion des ZPE's ist jedoch noch nicht geklärt. Im Jahre 2001 konnten erstmals NS3 exprimierende, nichtzytopathogene BVD-Viren vom Stamm NADL nachgewiesen werden (Qu, McMullan, and Rice 2001). Es wurde in diesen Experimenten ein BVDV mit bicistronischem Genom etabliert, das zusätzlich zu den viralen Sequenzen das Gen für die Puromycin-Acetyltransferase (pac) als Selektionsmarker trägt. Als Basis für dieses Konstrukt diente der zp BVDV-Stamm NADL. In biologischen Tests wie der Überprüfung der Plaquemorphologie, der Wachstumskinetik und der Zytopathogenität verhielt sich das aus diesem Konstrukt erzeugte Virus wie das Wildtypvirus NADL. Durch Zugabe des Antibiotikums Puromycin zum Zellkulturmedium konnten jedoch nzp Biotypen aus dem Virusstock selektioniert werden. Diese dann charakterisierten nzp NADL-Varianten zeigten in den Genomabschnitten, die für NS2 oder NS3 kodieren, keine Veränderungen, im Genombereich, der für das NS4B kodiert dagegen eine Mutation. Bei dieser das NS4B betreffenden Abweichung handelt es sich um eine Substitution des Tyrosins 2441 durch Cystein. Die Einführung dieser Mutation in das ursprüngliche zp Virus führte zum gleichen Ergebnis, nämlich der Generierung eines nzp Virus (Qu, McMullan, and Rice 2001). Besonders interessant war an diesen Befunden nicht nur, dass eine Mutation außerhalb des NS2/3-Bereichs den viralen Phänotyp verändern kann, sondern vor allem, dass das nzp NADL weiterhin NS3 exprimierte.

Im Folgenden sollte untersucht werden, welche Auswirkung eine Punktmutation mit der Substitution von Tyrosin durch Cystein im NS4B auf verschiedene andere Pestiviren hat.

#### **3.3.1 Konstrukte zur Einführung einer Mutation im NS4B**

Zur Einführung der Mutation in das Nichtstrukturprotein NS4B mittels der „gerichteten Mutagenese“ unter Zuhilfenahme entsprechender Primer wurden Hilfskonstrukte hergestellt. Für die zu untersuchenden Viren, BVDV CP7, BVDV NCP7, BVDV NewYork, BVDV Oregon, BVDV DI9 und CSFV Alfort/Tübingen,

lagen Gesamtklone vor, aus denen mittels Spaltung an geeigneten Schnittstellen oder PCR DNA-Fragmente hergestellt wurden, in die die Mutationen eingeführt werden konnten.

Die jeweils 1,8 kb großen Sal I / Sac I-Fragmente aus den vorliegenden Gesamtklonen der BVD-Viren CP7 bzw. NCP7 wurden in den ebenfalls Sal I / Sac I-gespaltenen Vektor pBluescript KS<sup>-</sup> inseriert und so die Konstrukte pRB22 (cp7) und pRB23 (ncp7) erhalten.

Das Plasmid pRB24 beinhaltet das EcoR I / Nco I-Fragment aus dem Oregon-Gesamtklon (pOR), (Kümmerer and Meyers 2000) im Vektorhintergrund des pCITE-2a.

Für den BVDV-Gesamtklon NewYork '93 wurde das Hilfskonstrukt pRB57 etabliert, das das 3,7 kb große Xba I / Xho I-Fragment des NewYork '93 im pBluescript KS<sup>-</sup>-Vektor trägt. Bei dem BVDV-Stamm NewYork '93 handelt es sich um ein Virus der Spezies BVDV-2, das nach Infektion schwere Krankheitsbilder in Kälbern und Rindern erzeugt, die durch einen hämorrhagischen Verlauf gekennzeichnet sein können.

Das Konstrukt „pRB25“ für die Mutagenese der Sequenz des CSFV-Stamms Alfort/Tübingen enthielt das 3,1 kb große Eco RI / Pst I-Fragment des vorliegenden Gesamtklons und wurde in den Vektor pCITE-2a ligiert.

In alle genannten Viren sollte unter Verwendung der entsprechenden Hilfskonstrukte die fragliche Mutation im Genbereich des NS4B eingeführt werden.

Nach Überprüfung der Hilfskonstrukte sowohl vor als auch nach durchgeführter Mutagenese mittels Kontrollspaltung und Sequenzierung wurden die veränderten Genfragmente in ihre Ausgangskonstrukte zurückgesetzt. Zusätzlich wurde das veränderte Sal I / Sac I-Fragment aus dem Hilfsvektor pRB22 in das für das DI9 kodierende Konstrukt integriert. Das DI9 ist eine natürlich vorkommende BVDV-Deletionsmutante, der die Sequenzen fehlen, die für die Strukturproteine und das NS2 kodieren. Die DI9-RNA ist zur autonomen Replikation fähig, stellt also ein Replikon dar, ist aber nicht in der Lage, die replizierte RNA in Viruspartikel zu verpacken. Aus diesem Grund ist die Koinfektion mit einem Virus notwendig, das über die Information für die Strukturproteine verfügt und so als Helfervirus für das DI9 fungiert. Die so *in*

*trans* bereitgestellten Strukturproteine dienen dazu, das Genom des DI9 in infektiöse Partikel zu verpacken.

**Sequenzvergleich des NS4B-Genabschnitts:**

CP7

Nt 7431-7460	ggg	tcc	atc	tcg	gac	tat	gca	tca	gag	gga
AS	G	S	I	S	D	Y	A	E	S	G

NCP7

Nt 7405-7434	ggg	tcc	atc	tcg	gac	tat	gca	tca	gag	gga
AS	G	S	I	S	D	Y	A	E	S	G

DI9

Nt 3109-3138	gga	tcc	atc	tca	gat	tat	gca	tcc	gga	gga
AS	G	S	I	S	D	Y	A	S	G	G

Oregon

Nt 7425-7434	ggg	gct	atc	tca	gac	tat	gca	gct	gga	gga
AS	G	A	I	S	D	Y	A	A	G	G

NewYork

Nt 7461-7490	gac	gca	ctg	gta	gac	tac	tcc	aaa	caa	ggg
AS	D	A	L	V	D	Y	S	K	Q	G

CSFV-Alfort

Nt 7408-7437	gaa	gca	gtg	acc	aat	tat	gcg	aga	gag	ggc
AS	E	A	V	T	N	Y	A	R	E	G

										tgc
Mutation im NS4B										<b>C</b>

**Abb. 13:** Dargestellt ist ein Vergleich von Sequenzen aus dem NS4B-Genfragment von Pestiviren. Hervorgehoben ist die Aminosäure Thyrosin (Y), die in den Mutanten durch Cystein (C) substituiert wurde.

**3.3.2 Erzeugung und Analyse von Viren mit der NS4B Mutation**

Gereinigte DNA der die Mutation tragenden Plasmide wurde zur Erzeugung authentischer 3'-Enden mit Xma I (CSFV-Stamm Alfort) bzw. Srf I (BVDV-Stämme) linearisiert und als DNA-Matrize für die *in vitro* Transkription eingesetzt. Nach der Transkription mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase wurden dem Reaktionsansatz durch Gelfiltration mit Sephadex G-50 niedermolekulare Komponenten entzogen; Ziel ist dabei vor allem freie NTPs zu entfernen, die

bei der RNA-Transfektion stören würden. Anschließend wurde die transkribierte RNA noch durch Phenol/Chloroformextraktion und Ethanolfällung gereinigt. Zur Überprüfung der erfolgreichen *in vitro* Transkription wurden 3 µl des Transkriptionsansatzes im denaturierenden Agarosegel aufgetrennt. Im Folgenden wurde untersucht, ob die Transfektion von geeigneten Zielzellen mit *in vitro* transkribierter RNA zur Bildung von infektiösen Viren führt. Hierzu wurden 5 µl des Transkriptionsansatzes für die Transfektion von SK6- (CSFV) bzw. MDBK-Zellen (BVDV) eingesetzt.

Im Falle des DI9 wurden die zu transfizierenden MDBK-Zellen am Tag zuvor mit dem NCP7-Wildtyp-Virus mit einer m.o.i. von 1 infiziert. Das NCP7 diente in diesem Fall als Helfervirus, das *in trans* die Strukturproteine sowie p7 und NS2 bereitstellt und so für die Verpackung der Erbinformation des DI9 in infektiöse Partikel sorgt.

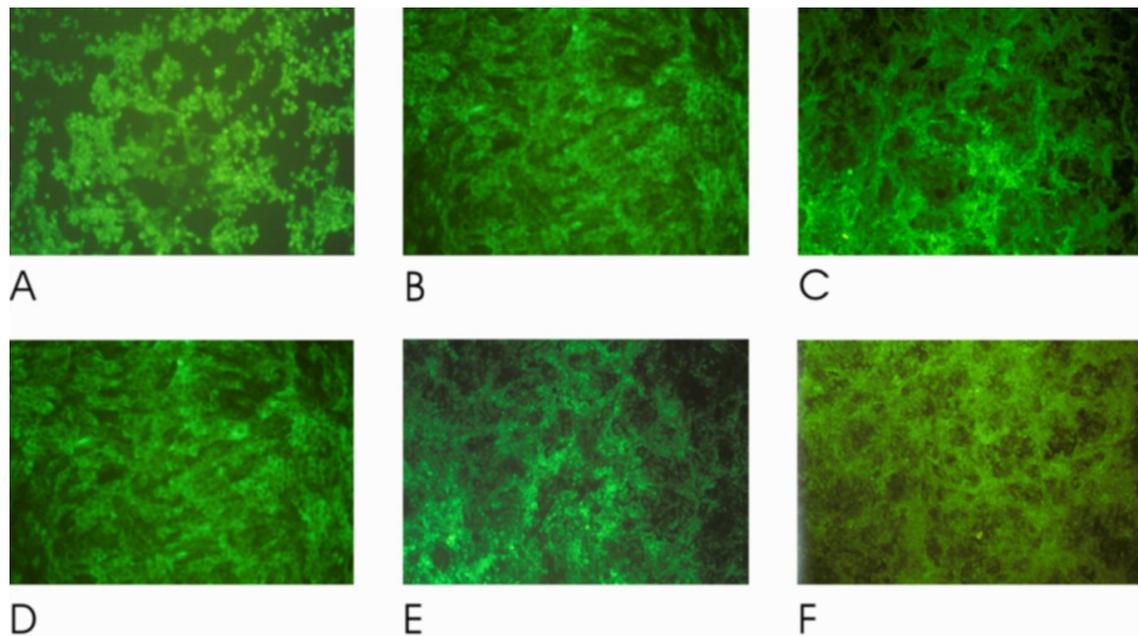
Die Transfektion erfolgte wie zuvor beschrieben nach der DEAE-Dextran-Methode. 72 h nach der Transfektion wurden die Zellen durch Behandlung mit Trypsin aus der Kulturschale abgelöst und im geeigneten Verhältnis weiter passagiert. Eine erneute Passage erfolgte weitere drei Tage später. Als Kontrolle diente RNA der Wildtypen der verwendeten Pestiviren, die *in vitro* transkribiert wurde.

72 h nach der Transfektion wurden die Zellen umgesetzt. Nach weiteren 24 h sowie nach fünfmaliger Passage wurde untersucht, ob virusspezifische Proteine in der Zelle gebildet worden waren. Es konnte eine diffuse Verteilung von zerstörten bzw. abgekugelten Zellen im Zellrasen der mit dem CP7-WT-Virus infizierten Zellen beobachtet werden, was als Hinweis auf die Replikation des zp Virus gelten konnte. Bei keinem der anderen Ansätze war die Ausbildung eines ZPE zu sehen. Nach der Fixierung des Zellrasens mit Methanol / Aceton (1:1) bei -20 °C wurden die infizierten Zellen mit spezifischen monoklonalen Antikörpern inkubiert (CP7, NCP7 und deren Mutanten mit dem mAk-Mix: „BVD-Mix“ und CSFV und Mutante mit „α-A18“). Nach der Inkubation dieses 1. Ak für 1 h bei 37 °C erfolgte die Behandlung mit dem FITC markierten 2. Antikörper, ebenfalls für 1 h bei 37 °C. Ein intakter Zellrasen war in allen mit den NS4B-Mutanten sowie in den mit den nzp-WT-Viren infizierten Kavernen zu erkennen (Abb. 14).

Im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Mutanten konnten für DI9c nach Transfektion keine positiven Zellen detektiert werden. Ein infektiöses Virus aus dem veränderten DI9c-Konstrukt scheint somit nicht lebensfähig zu sein. In den zell- und molekularbiologischen Untersuchungen konnte in diesem Fall nur das nzp Virus, mit dem die Zellen zuvor infiziert wurden, nachgewiesen werden.

Zur weiteren Überprüfung wurden nicht infizierte MDBK-Zellen durch Elektroporation mit *in vitro* transkribierter RNA von DI9c bzw. Mut-NS4B-DI9c transfiziert. Diese Methode erreicht wesentlich höhere Transfektionseffizienzen und ermöglicht somit den Nachweis von RNA-Replikation unabhängig von Neuinfektion von Zellen. In Zellen, die mit RNA des DI9c transfiziert wurden, konnte in der indirekten Immunfluoreszenz mit dem monoklonalen Antikörper „Code 4“ das Nichtstrukturprotein NS3 nachgewiesen werden. Dieser Befund dient als Nachweis der selbständigen Replikation des DI9c. Dagegen war im Falle von mit der Mutante Mut-NS4B-DI9c transfizierten MDBK-Zellen die autonome Replikation nicht nachweisbar. Damit bestätigte sich der Verdacht, dass die DI9c-Mutante nicht lebensfähig war.

Um zu zeigen, dass in den anderen Ansätzen tatsächlich genetisch veränderte Viren erzeugt worden waren, sollte die Sequenzveränderung im Genom der rekombinanten Viren nachgewiesen werden. Dazu wurden Zellen mit den erhaltenen Viren infiziert. Nach 24 h erfolgte die Isolierung von Gesamtzell-RNA. Ausgehend von dieser isolierten RNA wurde eine RT-PCR mit geeigneten Oligonukleotiden (CSFV: „hcv57-1.seq“ und „csfv7617.rev“; CP7, NCP7: „B35-2.seq“ und „BVDV-O.rev“; DI9c: „panpesti.seq“ und „bvdv-O.rev“; NewYork: „cm38.seq“ und „cm57.rev“; Oregon: „N-NS4A.seq“ und „C-NS4B.rev“) durchgeführt. Als Vergleich diente RNA aus mit den jeweiligen Wildtypen transfizierten Zellen. Nach Auftrennung der RT-PCR-Produkte im Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel konnten die DNA-Fragmente nachgewiesen werden. Eine PCR-Kontrolle, die ohne Zugabe von viraler RNA durchgeführt wurde, lieferte kein Amplifikationsprodukt. Die jeweiligen Reste der PCR-Produkte wurden mit dem „NucleospinExtract-Kit“ aufgereinigt und in 50 µl A. dest. eluiert. Jeweils 2 µl der Eluate wurden zur Sequenzierung eingesetzt.



**Abb. 14: Nachweis lebensfähiger NS4B-Mutanten verschiedener Pestiviren**

Charakteristisch für zp BVD-Viren ist die Fähigkeit, Gewebekulturzellen zu lysieren. Im Falle einer starken Lyse der Zellen werden Löcher im Zellrasen sichtbar.

Um die Lebensfähigkeit der NS4B-Mutanten zu untersuchen, wurden MDBK-Zellen (NCP7 und CP7 sowie deren Mutanten) bzw. SK6-Zellen (CSFV-Alfort und Mutante) mit einer m.o.i. von 1 infiziert und die Entwicklung beobachtet. Nach 3 Tagen wurde eine Immunfluoreszenz mit spezifischen mAk durchgeführt.

A: MDBK-Zellen mit CP7-WT,

D: MDBK-Zellen mit Mut-NS4B-CP7

B: MDBK-Zellen mit NCP7-WT,

E: MDBK-Zellen mit Mut-NS4B-NCP7

C: SK6-Zellen mit CSFV-WT,

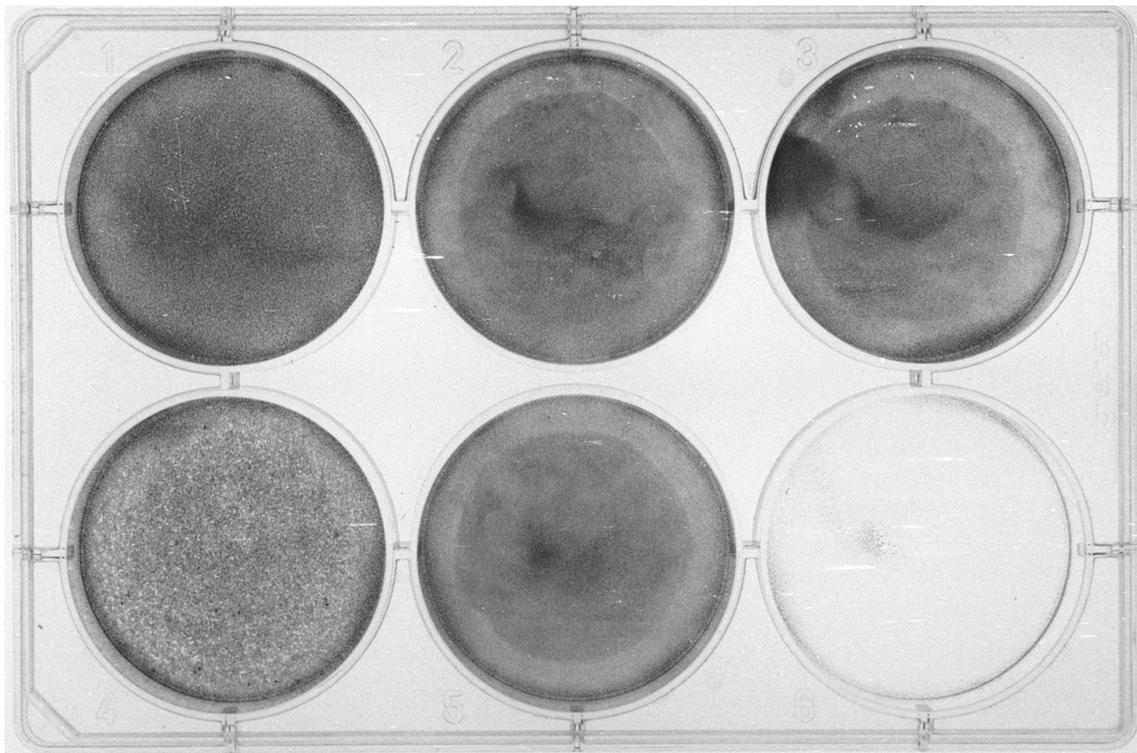
F: SK6-Zellen mit Mut-NS4B-CSFV

### 3.3.3 Stabilität der Mutanten im jeweiligen Gesamtklon

Die Sequenzierung zeigte, dass die jeweilige Mutation sich in den untersuchten Viren (NCP7, CP7, NewYork '93 und Alfort) über fünf Passagen hinweg als stabil erwies. Verglichen mit den jeweiligen Wildtypen zeigten sich keine offensichtlichen Veränderungen im Phänotyp in der Zellkultur. Ausnahme waren das CP7-Virus und seine Mutante. Der Wildtyp des BVDV CP7 zeigte wie zu erwarten einen ZPE. Das entsprechende Virus mit dem Aminosäure-Austausch im NS4B verursachte jedoch keine Lyse der Zellkultur. Zur Dokumentation der Ergebnisse wurde eine Kristallviolett färbung der Zellen nach Infektion mit den verschiedenen BVDV und CSFV durchgeführt. Um den möglichen zytopathischen Effekt der NS4B-Mutanten nachweisen zu können, wurden MDBK-Zellen (NCP7 und CP7 sowie deren Mutanten) bzw. SK6-Zellen (CSFV-Alfort und Mutante) mit einer m.o.i. von 0,1 infiziert und die Entwicklung beobachtet. Nach 24 h konnte eine diffuse Verteilung von zerstörten bzw. abgekugelten Zellen im Zellrasen der mit dem CP7-WT-Virus infizierten Zellen beobachtet werden. Insgesamt 72 h post infectionem wurden die Zellen mit

5 %iger Formalinlösung fixiert und anschließend mit 1 %iger Kristallviolett-lösung überschichtet. Man erkennt den intakten Zellrasen in allen mit den NS4B-Mutanten sowie in den mit den nzp-WT-Viren infizierten Kavernen. Ein ZPE und die damit verbundene Lyse der Zellen ist ausschließlich in den mit dem CP7-WT infizierten Zellen in der Vertiefung sechs zu erkennen. Hier konnten keine zellulären Proteine mehr mit dem Farbstoff Kristallviolett gefärbt werden (Abb. 15). Damit war gezeigt, dass diese Mutation nicht nur den BVDV Stamm NADL, sondern auch andere zp Biotypen in nzp Viren wandelt. Interessanterweise zeigte sich auch zwischen CSFV Alfort/Tübingen und seiner Mutante ein Unterschied. Während die mit diesem WT infizierten Zellen in der Kristallviolettfärbung eine leicht gebrochenen Färbung zeigten, war die Kaverne mit der CSFV-NS4B-Mutante gleichmäßig angefärbt. Dies deutet darauf hin, dass CSFV Alfort/Tübingen doch eine gewisse Zellschädigung herforruft, die nach der Mutation des Tyrosins ausbleibt.

Die Lebensfähigkeit und Stabilität der Mutanten im Vergleich mit den jeweiligen Wildtypen wurde über fünf Passagen verfolgt. Molekularbiologische Untersuchungen, wie die Sequenzierung der RT-PCR-Produkte, zeigten, dass nach derartiger Vermehrung der Mutanten keine Reversion über den genannten Zeitraum auftrat. Zur Abklärung, ob die jeweiligen im NS4B veränderten Viren Wachstumsnachteile gegenüber den Wildtypviren aufwiesen, wurden vergleichende Wachstumskurven ermittelt und verglichen. Hierzu wurden entsprechende Zellen mit den zu testenden Viren mit einer m.o.i von 0,01 infiziert und für verschiedene Zeiträume, von 12 bis 124 h, inkubiert. Das jeweilige Wildtypvirus diente als Kontrolle. Diese Ansätze wurden nach der entsprechenden Zeit bis zur Titration bei  $-72\text{ °C}$  gelagert. Die Untersuchung erfolgte in Triplikaten. Anhand der Wachstumskurven lässt sich erkennen, dass die Viren mit der Veränderung im NS4B gegenüber ihren WT-Vergleichsviren keine signifikanten Wachstumsvor- oder Nachteile haben.

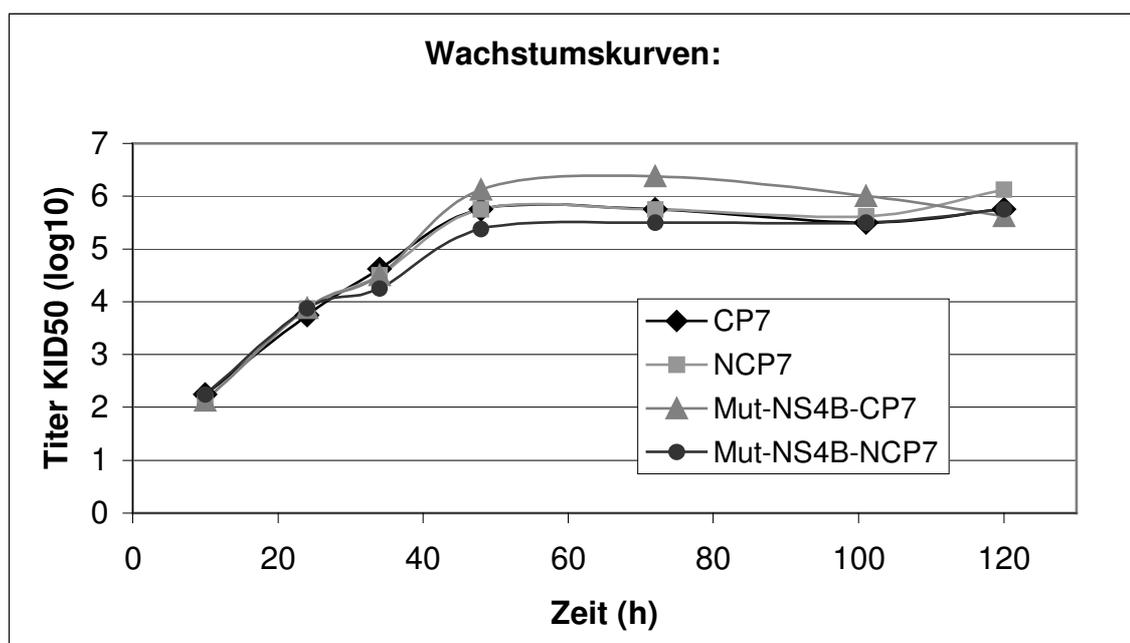


**Abb. 15: NS4B-Mutanten verschiedener Pestiviren**

Kristallviolett färbung von Zellen, die mit verschiedenen BVDV und CSFV infiziert worden waren. Die Färbung wurde 72 h nach der Infektion (m.o.i. = 0,1) durchgeführt.

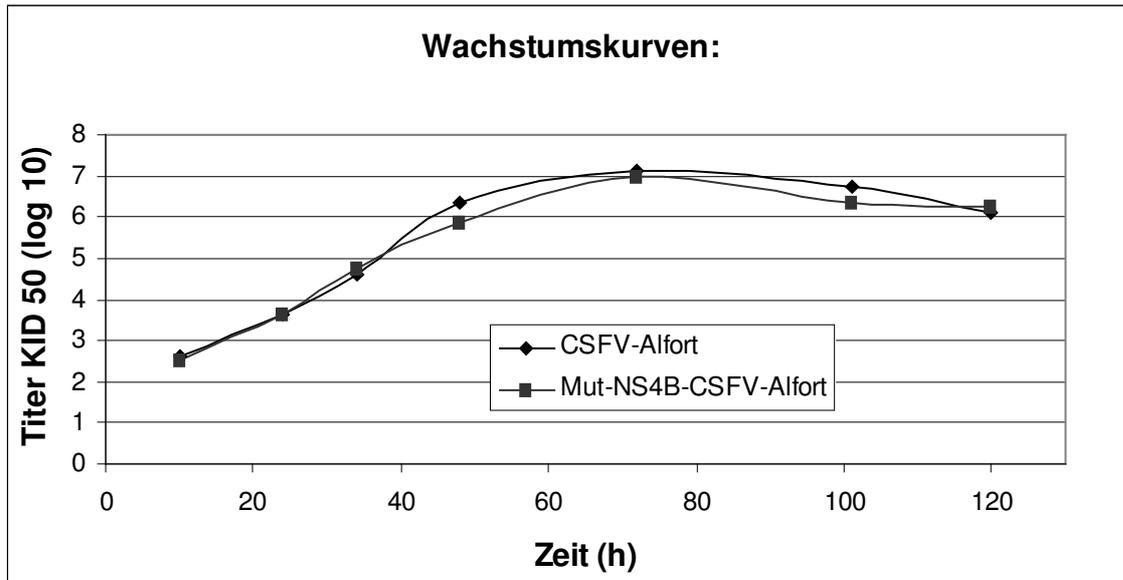
Feld 1: SK6-Zellen mit CSFV-NS4B-Mutante,  
 Feld 2: MDBK-Zellen mit NCP7-NS4B-Mutante,  
 Feld 3: MDBK-Zellen mit CP7-NS4B-Mutante,

Feld 4: SK6-Zellen mit CSFV-WT  
 Feld 5: MDBK-Zellen mit NCP7-WT  
 Feld 6: MDBK-Zellen mit CP7-WT

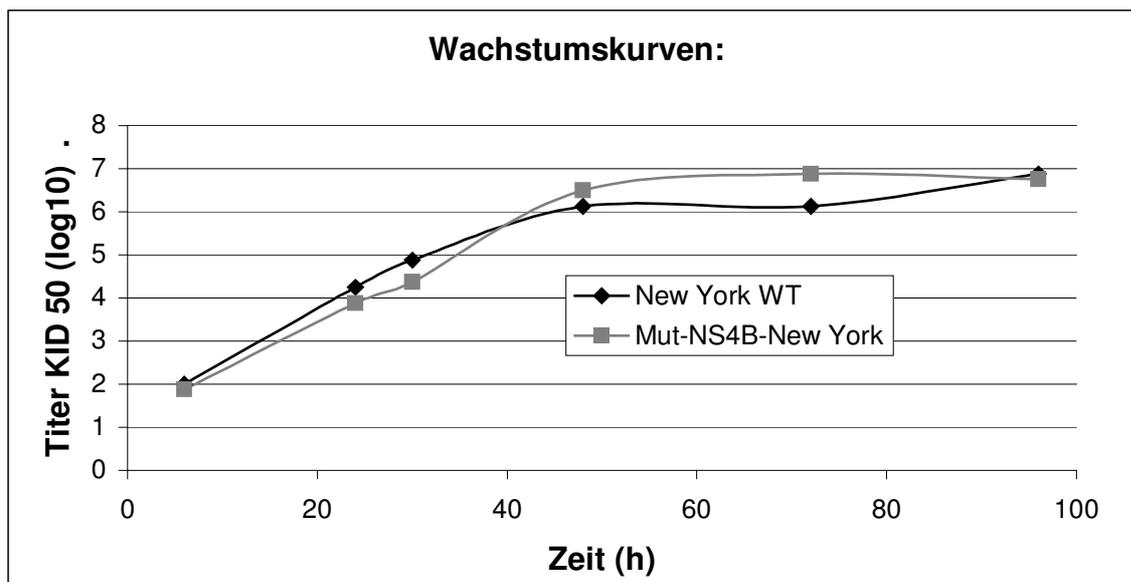


**Abb. 16: Wachstumskurven von CP7, NCP7 und deren NS4B-Mutanten**

Abgetragen sind die Titer (KID50) im Verlauf der Zeit. Die Kurven von NCP7 und CP7 fallen in vielen Punkten zusammen.



**Abb. 17: Wachstumskurven von CSFV-Alfort und dessen NS4B-Mutante**  
 Abgetragen sind die Titer (KID50) im Verlauf der Zeit

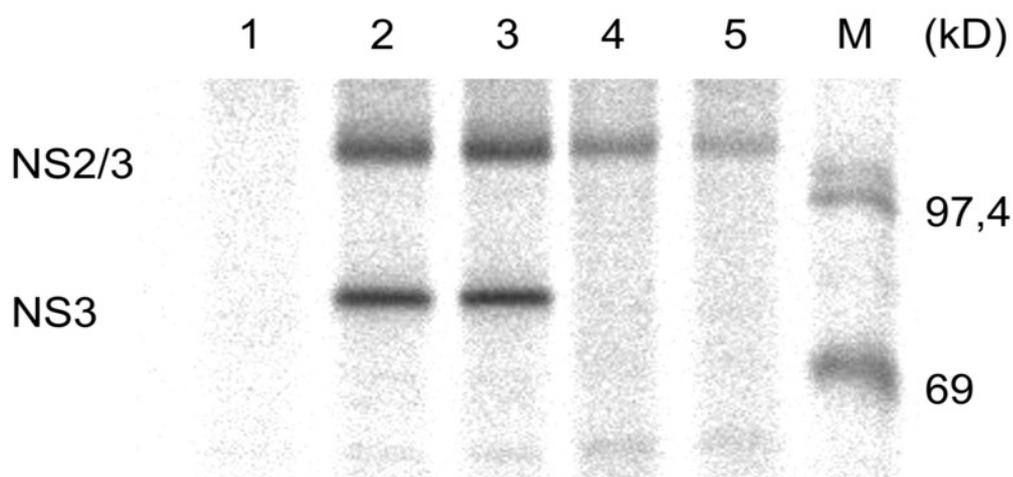


**Abb. 18: Wachstumskurven von BVDV New York und dessen NS4B-Mutante**  
 Abgetragen sind die Titer (KID50) im Verlauf der Zeit.

### 3.3.4 Überprüfung der NS2/3-Spaltung der NS4B-Mutanten

Zur Überprüfung, ob die Veränderung des NS4B zu einem veränderten Spaltverhalten des Nichtstrukturproteins NS2/3 in BVD-Viren führt, wurden KOP-R-Zellen mit den entsprechenden Viren mit jeweils einer m.o.i. von 1 infiziert und 24 h nach Infektion mit [<sup>35</sup>S] Methionin / [<sup>35</sup>S] Cystein metabolisch markiert. Für die gewünschte Darstellung des NS3 wurde eine Radioimmunpräzipitation durchgeführt. Hierfür wurde wiederum das anti-A3-Serum verwendet. Die Analyse der präzipitierten Proteine mittels Doucet-SDS-PAGE und Fluorographie zeigte, dass in den mit BVDV CP7 und dessen NS4B-Mutante infizierten Zellen NS3 in annähernd äquivalenten Mengen exprimiert wurde. In Zellen, die hingegen mit den Viren NCP7 und Mut-NS4B-NCP7 inokuliert worden waren, konnte keine NS3-Expression detektiert werden.

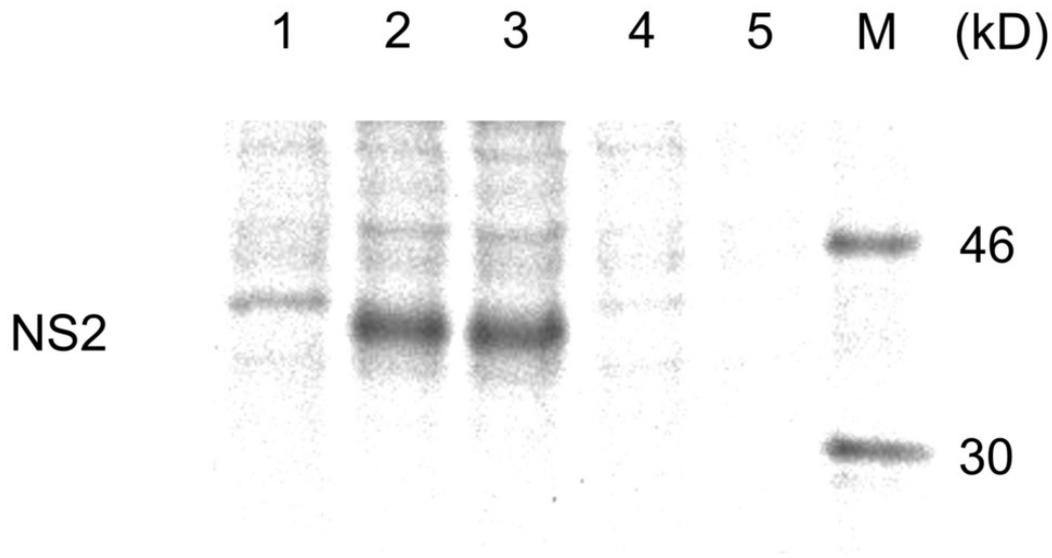
Ein vergleichbares Bild ergab sich für den Nachweis des NS2-Proteins. Die Präzipitation dieses Proteins aus Zellextrakten erfolgte mit dem Antiserum anti-Pep6. Eine das NS2 darstellende Bande konnte nur in Extrakten nachgewiesen werden, deren Zellen mit CP7 und Mut-NS4B-CP7 infiziert wurden.



**Abb. 19: Radioimmunpräzipitation zur NS2/3-Spaltung von NS4B-Mutanten des BVD-Stammes CP7. Nachweis des NS3.**

Nach metabolischer Markierung mit [<sup>35</sup>S] Methionin / [<sup>35</sup>S] Cystein wurden die Extrakte infizierter Zellen für die Immunpräzipitation eingesetzt. Die Präzipitation erfolgte mit dem anti-A3-Serum. Die Präzipitate wurden durch SDS-PAGE (12% PAA, Gelsystem nach Doucet / Trifaro) unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Die Zahlen am rechten Rand geben die Molekulargewichte von Standardproteinen in kD an. Die Quantifizierung der NS2/3-Spaltung in Zellen, die mit CP7 bzw. Mut-NS4B-CP7 infiziert worden waren, ist in Abb. 21 zu sehen.

Spur 1: nicht infizierte KOP-R-Zellen, Spur 2: WT Stamm CP7, Spur 3: Mut-NS4B-CP7,  
 Spur 4: WT Stamm NCP7, Spur 5: Mut-NS4B-NCP7, M: Größenmarker



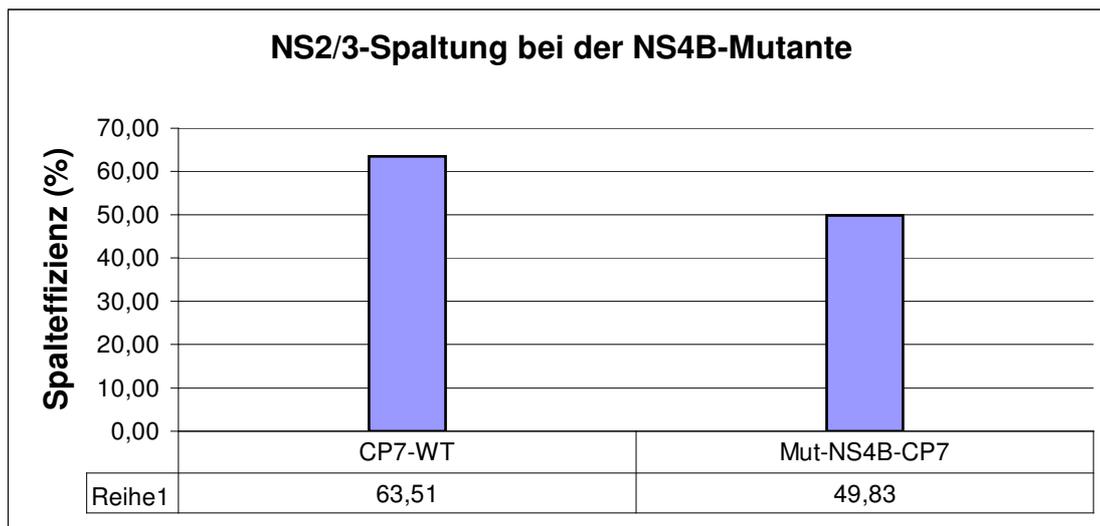
**Abb. 20: Radioimmunpräzipitation zur NS2/3-Spaltung von NS4B-Mutanten des BVD-Stammes CP7. Nachweis des NS2.**

Nach metabolischer Markierung mit [<sup>35</sup>S] Methionin / [<sup>35</sup>S] Cystein wurden das Protein NS2 durch Immunpräzipitation angereichert. Die Präzipitation erfolgte mit dem anti-Pep6-Serum. Die Präzipitate wurden durch SDS-PAGE (10% PAA, Gelsystem nach Schägger / Jagow) unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Die Zahlen am rechten Rand geben die Molekulargewichte von Standardproteinen in kD an.

Spur 1: nicht infizierte KOP-R-Zellen, Spur 2: WT Stamm CP7, Spur 3: Mut-NS4B-CP7,  
 Spur 4: WT Stamm NCP7, Spur 5: Mut-NS4B-NCP7, M: Größenmarker

### 3.3.5 Spalteffizienz der NS4B-Mutante im Vergleich zum zp Wildtyp

Die Analyse der präzipitierten Proteine nach Doucet-SDS-PAGE und Fluorographie zeigte, dass die Spaltung des NS2/3 in der Mutante und dem entsprechenden Wildtypvirus unterschiedlich stark ausgeprägt war. Verglichen mit dem Wildtyp-Virus CP7 spaltet die NS4B-Mutante das Nichtstrukturprotein NS2/3 in NS2 und NS3 in einem geringeren Umfang.



**Abb. 21: Vergleich der NS2/3-Spaltung des CP7-WT und der NS4B-Mutante.**

Zur Ermittlung der abgetragenen Werte wurden für beide Viren drei unabhängige Experimente durchgeführt. Die Proteine NS2/3 und NS3 wurden jeweils mit dem anti-A3-Serum präzipitiert und die Präzipitate mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Mit Hilfe des Phosphor-Imagers wurde die Stärke der NS2/3- und NS3-Signale ermittelt. Unter Berücksichtigung der Zahl der Methionine und Cysteine in den jeweiligen NS2/3- bzw. NS3-Proteinen wurde der prozentuale Anteil des NS3 an der Gesamtmenge von NS3 / NS2/3 berechnet.

### 3.3.6 Überprüfung der RNA-Menge

Eine seit längerem diskutierte Hypothese besagt, dass zp BVDV in infizierten Zellen mehr RNA produzieren als die homologen nzp Viren. Weiterführende Untersuchungen sollten diese Hypothese anhand der zuvor erwähnten Mutanten überprüfen. Diese Analysen sollten mit Hilfe einer quantitativ-kompetitiven RT-PCR durchgeführt werden. Dabei wird der Probe mit der unbekanntem Menge der zu bestimmenden Nukleinsäure eine definierte Menge eines internen Standards zugegeben, der mit den gleichen Primern reagiert. Durch Einführung einer Deletion wird die Bande des Standards vom zu bestimmenden Produkt unterscheidbar. Durch Variation der Menge des internen Standards bei gleichbleibender Konzentration der zu untersuchenden Nukleinsäure ergibt sich für jeden Reaktionsansatz im Agarosegel ein spezifisches Bandenmuster. Bei einem Überschuss eines der Reaktionspartner verschiebt sich die Stärke der Bande zugunsten des überwiegenden Konkurrenten. Ziel ist das Erreichen des Äquivalenzpunktes, der durch zwei gleich stark ausgeprägte Banden im Agarosegel dargestellt wird.

### **3.3.6.1 Konstrukt zur Quantifizierung**

Zur Bestimmung der RNA-Menge des Wildtyps und der Viren mit der Mutation im NS4B wurde ein DNA-Konstrukt generiert, das in einer PCR mit den gleichen Primern hybridisiert wie auch die eingesetzte virale RNA. Dieses Konstrukt enthielt das 5'-terminale Not I / Nde I-Fragment aus dem CSFV-Gesamtklon RB50 im Hintergrund des Vektors pCITE-2a und wurde als pRB55 bezeichnet. Um in der späteren RT-PCR das Fragment von dem von der RNA generierten Amplifikat unterscheiden zu können, wurde das Fragment mittels PCR gestützter Mutagenese so verändert, dass es durch eine interne Deletion um 36 Nukleotide verkürzt wurde. Dazu wurde das Plasmid pRB55 in einer PCR mit den Primern „pan315.seq“ und „pan270.rev“ eingesetzt und anschließend einer Dpn I- und EcoR I-Spaltung unterzogen. Dieser veränderte Abschnitt befindet sich in dem Bereich des Plasmids, der der 5'-nichtkodierenden Region des Genoms entspricht. Das nichtmethylierte intakte PCR-Produkt wurde nach der Reinigung mit dem „NucleospinExtract-Kit“ und der Ligation für die anschließende Transformation eingesetzt. Das Vorhandensein der Verkürzung wurde durch Testspaltungen bzw. Sequenzierung von gereinigter DNA überprüft. Das erhaltene Produkt wurde als RB56 bezeichnet. Mit Hilfe dieses Konstrukts wurde eine PCR mit den Primern „Panpesti.seq“ und „Panpesti.rev“ durchgeführt. Das daraus resultierende PCR-Produkt wurde bei den folgenden Quantifizierungen als interner Standard eingesetzt. Zur Quantifizierung der viralen RNA wurde das unter 3.3.6.1 generierte PCR-Produkt mit dem „NucleospinExtract-Kit“, zur Abtrennung überschüssiger Primer und Nukleotide, gereinigt und dann photometrisch die  $OD_{260}$  gemessen, um die DNA-Konzentration zu bestimmen.

### **3.3.6.2 Quantitativ-kompetitive RT-PCR**

Zur Quantifizierung der RNA-Mengen, die die NS4B-Mutanten bzw. die entsprechenden Ausgangsviren nach Infektion erzeugen, wurden MDBK-Zellen mit den unter 3.3.2 beschriebenen Viren CP7, NCP7, Mut-NS4B-CP7 und Mut-NS4B-NCP7 in Triplikaten mit einer m.o.i. von 1 infiziert. Nach 24 h wurde die RNA der infizierten Zellen mit dem Trizol-Kit präpariert. Nach photometrischer Bestimmung der RNA-Konzentration wurden je Ansatz 10 ng Gesamt-RNA in

eine RT-Reaktion eingesetzt, die neben dem Primer „Panpesti.rev“ auch ein Oligonukleotid für das „housekeeping“-Enzym Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) enthielt. Dieses Enzym der Phosphatketten-Phosphorylierung der Glykolyse wird in allen Zellen konstitutiv exprimiert und somit ist die mRNA immer in vergleichbaren Mengen in den Zellen vorhanden. Daher eignet sich der Nachweis dieser RNA gut als interne Kontrolle.

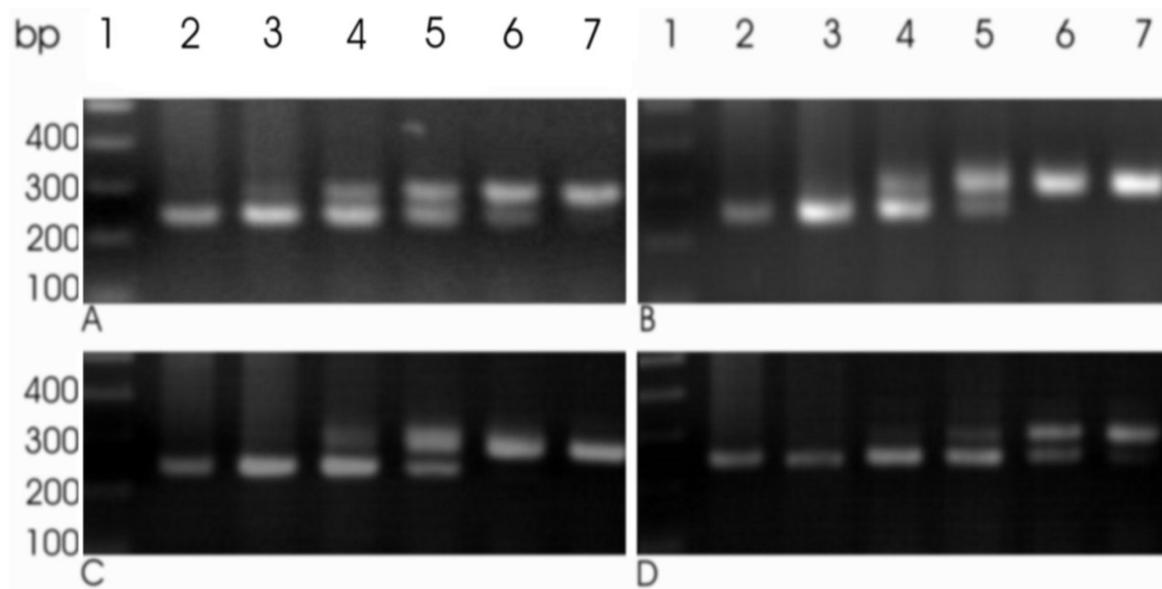
Im Anschluss an die RT-Reaktion wurden jeweils 2 µl dieses Ansatzes in die Polymerase Kettenreaktion eingesetzt.

Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe in 10fachen Abstufungen ausgehend von 10 ng bis zu einer Konzentration von 100 fg angelegt. Für den Quantifizierungsansatz wurden in der PCR jeweils 2 µl des RT-Ansatzes und 1 µl des auf eine genaue Konzentration eingestellten internen Standards aus 3.3.6.1, als Kompetitor, eingesetzt. Ziel dieser Reaktion war es, den Äquivalenzpunkt, also diejenige Konzentration des Kompetitors zu ermitteln, bei der sich im abschließenden Agarosegel zwei gleich stark ausgeprägte Banden detektieren lassen. Da beide Fragmente gleiche Primerbindungsstellen und eine vergleichbare Größe besitzen, ist die Menge des in der PCR gebildeten Amplifikats primär nur von den eingesetzten Mengen der Matrizen abhängig. In Abb. 22 ist die untere Bande vom eingesetzten PCR-Fragment bestimmter Konzentration abgeleitet und die obere Bande wird ausgehend vom Genfragment aus der RT-Reaktion amplifiziert. Bei einem ungleichen Verhältnis, also einem Überschuss eines der in der Reaktion eingesetzten Templates, verschiebt sich die Bandenstärke zugunsten des überwiegenden Konkurrenten. Dieses Verfahren ist auf alle Pestiviren übertragbar, da die verwendeten Panpesti-Primer mit den Genomen aller zu diesem Genus gehörenden Viren hybridisieren.

Man erkennt in Abb. 22, dass die eingesetzten viralen RNAs zu deutlich unterschiedlichen Äquivalenzpunkten in der Analyse führen. Beim CP7-Wildtyp liegt das Gleichgewicht der Reaktionspartner, wie in Spur A5 zu erkennen ist, bei ca. 10 pg Kompetitor im Reaktionsansatz. Bei der entsprechenden NS4B-Mutante ist der Äquivalenzpunkt bei ca. 50 pg erreicht, also etwa im Bereich der Spuren C4 / C5. Beim Vergleich der Wildtyp-Viren mit den entsprechenden Mutanten wird eine Verschiebung des Äquivalenzpunktes erkennbar. Damit produziert das nichtzytotoxische Mut-NS4B-CP7-Virus um den Faktor fünf

mehr RNA als das vergleichbare Wildtypvirus. Beim Vergleich des NCP7 mit der entsprechenden Mutante fällt auf, dass hier das Wildtypvirus deutlich mehr RNA bildet.

In einer zweiten PCR werden zur Kontrolle ebenfalls 2  $\mu$ l des RT-Reaktionsansatzes eingesetzt. Hier wird jedoch das für die GAPDH spezifische Primerpaar verwendet. Diese Kontrollreaktion dient lediglich dem Nachweis, dass jeweils die gleiche Menge an RNA eingesetzt wurde. Aufgrund der gleichstarken Bandenausbildung der verschiedenen Reaktionen (Abb. 23) kann davon ausgegangen werden, dass die eingesetzte Menge an RT-Template stets konstant war.



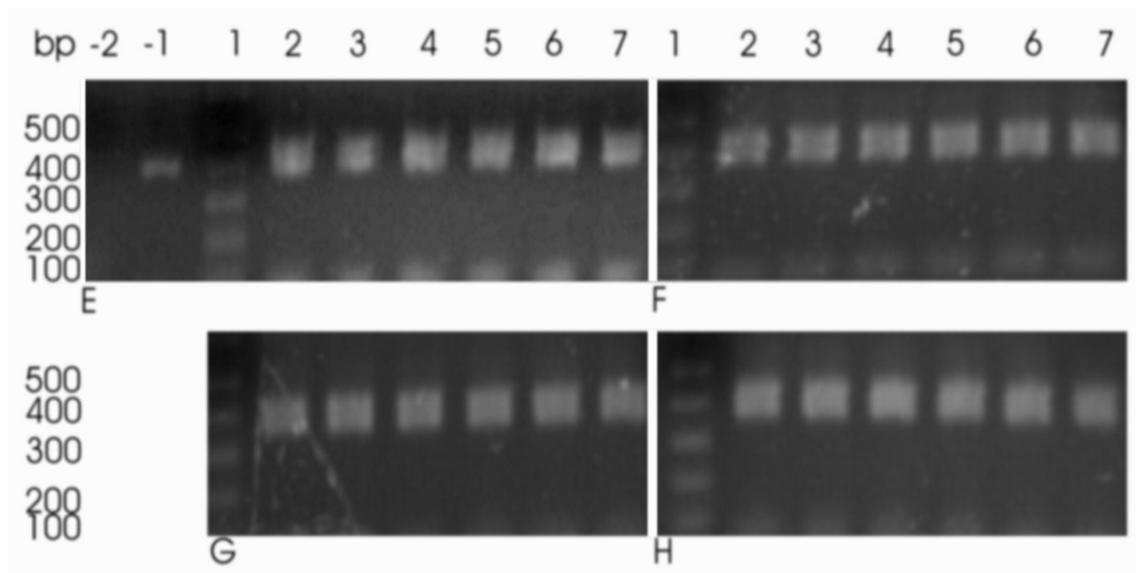
**Abb. 22: Quantitativ-kompetitive PCR.**

A, B, C und D zeigen die Bilder der Agarosegele zur Auswertung der quantitativ-kompetitiven PCR. Als Matrizen dienten je Ansatz jeweils 2  $\mu$ l RT-Produkt sowie 1  $\mu$ l der Kompetitor-Verdünnungen.

A: WT-CP7  
 Spur 1: Größenmarker,  
 Spur 4: 100 pg Kompetitor,  
 Spur 7: 100 fg Kompetitor

B: WT-NCP7,  
 Spur 2: 10 ng Kompetitor,  
 Spur 5: 10 pg Kompetitor

C: Mut-NS4B-CP7,  
 Spur 3: 1 ng Kompetitor,  
 Spur 6: 1 pg Kompetitor



**Abb. 23: Interne Kontrolle der quantitativ-kompetitiven PCR mittels GAPDH-PCR.**

E, F, G und H zeigen die Agarosegelbilder der internen Kontrolle der quantitativ-kompetitiven PCR mittels GAPDH-PCR unter Verwendung spezifischer Oligonukleotid-Primer für die GAPDH-mRNA. Als Template dienten je Ansatz jeweils 2 µl des in der RT generierten Templates für die quantitativ-kompetitive PCR.

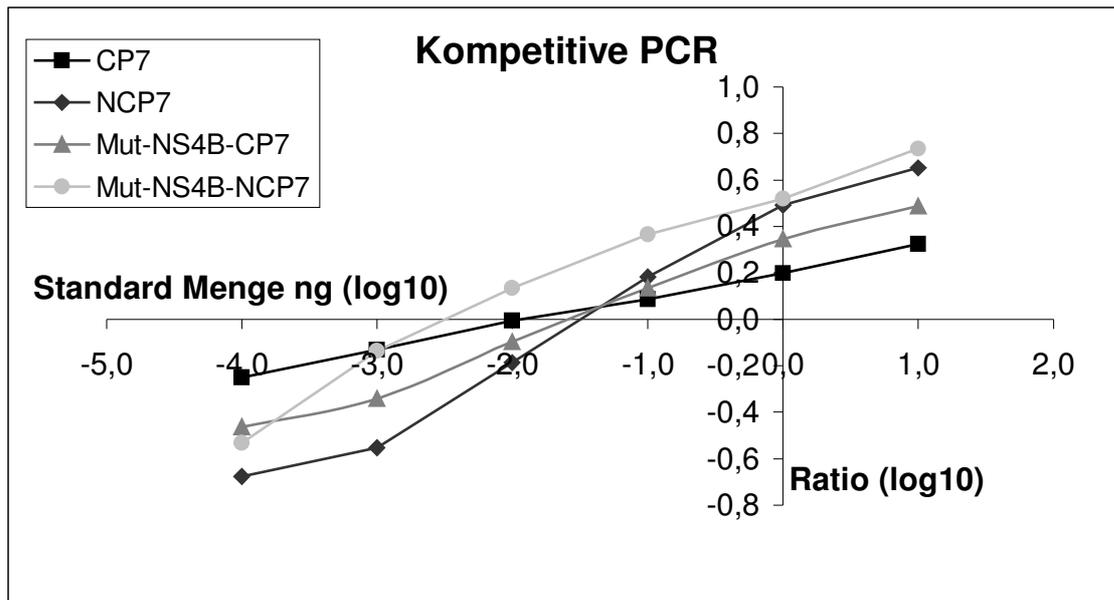
E: WT-CP7, F: NCP7, G: Mut-NS4B-CP7, H: Mut-NS4B-NCP7

Spur -2: Wasserkontrolle, Spur -1: nicht infizierte KOP-R-Zellen, Spur 1: Größenmarker, Spuren 2 – 7: Proben entsprechend der in der quantitativ-kompetitiven PCR bei A – D eingesetzten Templates.

Die Auswertung der quantitativ-kompetitiven PCR erfolgte mit Hilfe des Programms Tina 2.0. Hierzu wurden die Bilder der Agarosegele in den Rechner eingelesen und die relative Intensität der Banden ermittelt. Das molare Verhältnis zwischen der viralen cDNA und dem PCR-Produkt des Konstrukts (pRB56) wurde unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Sequenzlänge von viraler cDNA und Konstrukt wie folgt berechnet:

$$\left( \frac{\text{Signalintensität der viralen cDNA}}{\text{Signalintensität des Standard-PCR-Produkts}} \right) \times \left( \frac{\text{Größe viraler cDNA [in bp (283)]}}{\text{Größe des Standards [in bp (247)]}} \right)$$

Zur Ermittlung des Äquivalenzpunktes wurde der log<sub>10</sub> Wert der molaren Ratio gegen den log<sub>10</sub> Wert der Konzentration (ng/µl) des als internen Standard eingesetzten Fragments jeder Reaktion abgetragen. Der Schnittpunkt des Graphen mit der x-Achse stellt den Äquivalenzpunkt für die entsprechende Probe dar.



**Abb. 24: Auswertung der kompetitiven PCR**

Aufgetragen wurden die durch die Gleichung  $(\text{Signalintensität der viralen cDNA} / \text{Signalintensität des Standard-PCR-Produkts}) \times (\text{Größe viraler cDNA [in bp (283)]} / \text{Größe des Standards [in bp (247)])$  ermittelten Werte gegen die Konzentration des Standards. Der Äquivalenzpunkt ist am Schnittpunkt der Graphen mit der x-Achse erreicht.

Die Menge an viraler RNA in den infizierten Zellen unterscheidet sich um bis zu eine Größenordnung. Aus Abb. 24 kann abgelesen werden, dass die Viren NCP7 und Mut-NS4B-CP7 während der Replikation die größte Menge an RNA produzieren. Ferner ist festzustellen, dass ein einheitlicher Einfluss auf die Replikation durch die Veränderung im NS4B und somit auf die Menge an gebildeter RNA nicht festgestellt werden kann. Die NS4B-Mutante des nzp Virus bildet weniger RNA als das entsprechende Wildtypvirus, während die gleiche Mutation im Hintergrund des zp Virus zu erhöhter RNA Synthese führt. Bemerkenswert ist auch, dass in der hier dargestellten Analyse das NCP7-Wildtypvirus mehr RNA generiert als das CP7-Wildtypvirus. Das letztere Ergebnis ist besonders interessant, da vermehrte RNA Synthese als ein Grund für die Zythopathogenität von zp BVDV diskutiert wird.

Nichtzytopathogene BVD-Viren induzieren im Gegensatz zu zp Biotypen keine Interferon Typ I-Produktion in kultivierten bovinen Makrophagen.

Das Vorkommen doppelsträngiger RNA weist auf virale Replikation hin und ist ein guter Induktor für die Interferonsynthese. In nzp-BVDV infizierten Zellen jedoch ist dieser Mechanismus zur Virusabwehr offensichtlich blockiert (Schweizer and Peterhans 2001).

Viren des nzp Biotyps scheinen so über einen Mechanismus zur Unterdrückung eines Schlüsselements der antiviralen Abwehr der angeborenen Immunität zu verfügen. Da Interferon ebenfalls eine wichtige Rolle in der Einleitung der erworbenen Immunität spielt, ist eine Unterdrückung dieses Signals möglicherweise essentiell für die Etablierung persistenter Infektionen und der Immuntoleranz (Schweizer and Peterhans 2001; Peterhans, Jungi, and Schweizer 2003). Bisher war der entscheidende Unterschied zwischen zp und nzp BVD-Viren das Vorkommen des NS3 bei den zp Biotypen in der späteren Phase der Infektion. Die in dieser Arbeit generierte, das NS3 exprimierende NS4B-Mutante des BVDV-CP7-Virus sollte daher auf ihren Einfluss auf die Induktion der Interferonproduktion getestet werden. Von besonderem Interesse ist hierbei die Frage, welchen Einfluss NS3 auf die Steuerung der Interferonproduktion ausübt. Diese Arbeiten werden z. Zt. in Zusammenarbeit mit Dr. B. Charleston und Dr. J. McCauley in Compton, Großbritannien, durchgeführt; die Ergebnisse liegen noch nicht vor.

### **3.4 Bicistronischer Vektor**

#### **3.4.1 Konstruktaufbau**

Eine hochinteressante Frage im Zusammenhang mit der NS2/3 Spaltung bei BVDV ist, ob ein Virus lebensfähig ist, wenn das Protein vollständig gespalten wird. Hintergrund ist, dass in allen BVDV infizierten Zellen ungespaltenes NS2/3 nachweisbar ist, auch wenn es sich bei dem Virus um ein zp BVDV handelt. Eine Ausnahme bildet möglicherweise das BVDV Osloss, das im Polyprotein ein Ubiquitin enthält, das für eine so effiziente Spaltung sorgt, dass NS2/3 bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte. Außer dem BVDV Osloss gibt es noch DIs, die kein NS2/3 bilden, da aufgrund der im Genom vorhandenen Deletionen die NS2 kodierende Sequenz fehlt. Das Genom des am besten untersuchten DI9 stellt eine RNA dar, die in geeigneten Zellen autonom replizieren kann, der aber die kodierenden Sequenzen für alle Strukturproteine, das p7 und das NS2 fehlen. Somit kann die replizierte RNA nicht in Viruspartikel verpackt werden. Bei Koinfektion der Zelle mit einem Virus, das über die Information für die Strukturproteine und p7 sowie NS2 verfügt,

können die *in trans* bereitgestellten Proteine sowohl das Helfervirusgenom als auch die DI9 RNA in infektiöse Partikel verpacken.

Das in dieser Arbeit verwendete DI9-Gesamtklonkonstrukt (DI9c) ist im eigentlichen Sinne eine Kombination aus DI9- und CP7-Sequenzen mit der Genomorganisation des DI9. In diesem Konstrukt entspricht nur der Sequenzabschnitt, der die Deletion samt kurzer flankierender Sequenzen umfasst (Fragment XhoI – HpaI) der originären DI9 Sequenz, während die übrigen Sequenzanteile dem CP7 entlehnt sind.

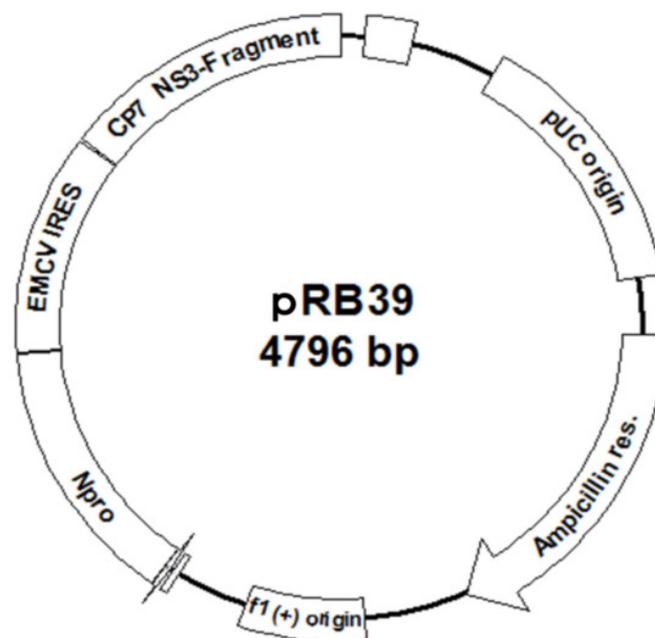
Um der Frage nachzugehen, ob ungespaltenes NS2/3 für die BVDV essentiell ist, wurde aufbauend auf den DI9c-Sequenzen ein Plasmid kreiert, in dem die Nichtstrukturproteine NS2 und NS3 nicht nur räumlich voneinander getrennt inseriert sind, sondern auch von verschiedenen internen Ribosomenbindungsstellen translatiert werden, so dass sie nicht Teile einer geschlossenen Polypeptidkette sein können. Weiterhin sollte dieses Konstrukt durch die Auswahl geeigneter Schnittstellen auch die Möglichkeit der Insertion zusätzlicher interessanter Sequenzen bieten.

Unter Verwendung der Oligonukleotidprimer „BVD2.2“ und „nprobam.rev“ sowie dem Konstrukt 798 (CP7-Gesamtklon) als Matrize wurde die das N<sup>pro</sup> kodierende Sequenz mit Teilen der 5'-NTR mit Hilfe einer PCR isoliert und am 3'-Ende mit einer BamH I-Schnittstelle versehen. Dieses 700 bp große PCR-Produkt wurde mit den Endonukleasen Xho I und BamH I gespalten und mit dem „NucleospinExtract-Kit“ aufgereinigt. Weiterhin wurde mit den Primern „ns3nco.seq“ und „ns3sac.rev“ ausgehend vom Plasmid 798 ein ebenfalls 700 bp großes 5'-terminales Fragment aus dem NS3-Sequenzbereich mittels einer PCR vermehrt. Das Reaktionsprodukt wurde mit den Enzymen Nco I und Sac I geschnitten, und ebenfalls mit dem „NucleospinExtract-Kit“ aufgereinigt.

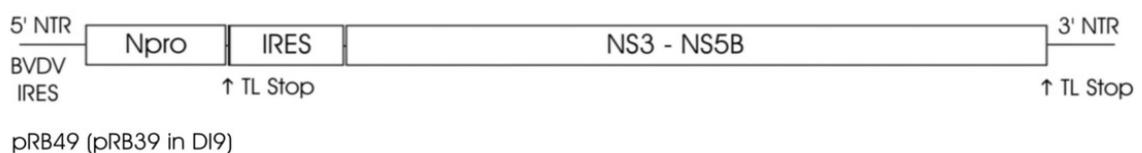
Zur Generierung der für das Konstrukt benötigten zweiten Ribosomenbindestelle wurde die IRES des EMCV durch eine Polymerasekettenreaktion mit den Oligonukleotidprimern „citelinker.seq“ und „pcite.rev“ ausgehend vom Plasmid „pCITE-2a“ amplifiziert. Die Spaltung des Produktes erfolgte mit den Nukleasen Nco I und BamH I. Anschließend erfolgte eine Reinigung mit dem „NucleospinExtract-Kit“.

Durch die Ligation der drei Fragmente in das Plasmid „pBlueskript KS“ wurde das Konstrukt pRB39 erhalten (Abb.25). Dieses Konstrukt wurde mit den

Enzymen Xho I und Sac I geschnitten, das freigesetzte Fragment isoliert und in den ebenfalls Xho I und Sac I gespaltenen DI9c-Gesamtklon (Konstrukt 768 II) ligiert. Das Plasmid wurde zur Transformation von E.coli HB101 Zellen verwendet. Eine Sequenzierung schloss die Überprüfung des nun als pRB49 bezeichneten Konstrukts ab. Die Translation des N<sup>pro</sup> wird in diesem Vektor durch die bereits im DI9c-Konstrukt vorhandene BVDV-IRES initiiert. Die zweite, über das Fragment aus dem pRB39 eingebrachte IRES des Picornavirus EMCV dient als Translationsstart für das NS3 und alle darauf folgenden Proteine.



**Abb. 25: Schematische Darstellung des pRB39.**



**Abb. 26: Schematische Darstellung des pRB49.**

### 3.4.2 Lebensfähigkeit des veränderten DI9c

Ausgehend vom Plasmid pRB49 wurde mit Hilfe der ivTs eine RNA abgeschrieben, die dem gewünschten, veränderten DI9c-Genom entsprach. Die sich anschließende DEAE-Dextran-Transfektion erfolgte mit Zellen, die einen Tag zuvor mit dem NCP7-BVD-Stamm als Helfervirus infiziert worden waren. Als Positivkontrolle diente RNA, die vom DI9c-Ausgangsplasmid translatiert worden war, während Mock transfizierte NCP7 infizierte Zellen eine Negativkontrolle darstellten. Letztere zeigten auch eine Woche post transfectionem keine Änderung in der Zellmorphologie. Die Zellen, welche mit der DI9c-RNA oder mit RNA abgeleitet vom pRB49 transfiziert wurden, zeigten dagegen nach drei Tagen einen deutlichen ZPE, was darauf hinweist, dass in beiden Fällen replikationskompetente RNAs erzeugt worden waren, die zudem einen ZPE induzieren können. Die Lyse des Zellrasens wurde über fünf Passagen beobachtet. Beide neu generierten Viren erwiesen sich als stabil und zeigten im direkten Vergleich keine auffälligen Unterschiede. Zusätzlich zu der lichtmikroskopischen Beurteilung wurde ausgehend von Zellen der ersten und fünften Passage RNA präpariert. Zur weiteren Charakterisierung wurde eine RT-PCR durchgeführt und die generierten Fragmente sequenziert, um die Stabilität der Veränderung zu überprüfen. Es konnten im analytischen Bereich keine Veränderungen festgestellt werden.

### 3.4.3 Konstrukt mit separiertem NS2 und NS3

Ziel dieser Untersuchungen war die Überprüfung der Lebensfähigkeit eines Virus, das zwar NS2 und NS3 aber kein NS2/3 exprimiert. Dazu sollte ein bicistronisches Konstrukt aufgebaut werden, bei dem das 5' nahe Cistron für die Proteine N<sup>Dro</sup> bis NS2 kodiert und das zweite Cistron, das unter der Kontrolle der EMCV IRES steht, für NS3 bis NS5B kodiert.

Unter Verwendung der Oligonukleotidprimer „B11.1“ und „ns2stop.rev“ sowie dem Konstrukt 834 (NCP7-Gesamtklon) als Template wurde der Bereich Nt 2320 bis 5135 der viralen Sequenz mit Hilfe einer PCR isoliert, ein Stop-Codon eingefügt und am 5'-Ende mit einer BamH I-Schnittstelle versehen. Dieses 2,8 kb große PCR-Produkt wurde mit den Endonukleasen EcoR I und BamH I gespalten und mit dem „NucleospinExtract-Kit“ aufgereinigt. Dieses

Fragment wurde in den mit denselben Enzymen gespaltenen Vektor „pBlueskript KS“ inseriert und so das Konstrukt pRB51b erhalten.

Ferner wurde aus dem Konstrukt 834 mit Hilfe der Nukleasen Xho I und EcoR I ein 2,7 kb großes Fragment isoliert, in den Vektor pRB51b inseriert und das Plasmid mit der Bezeichnung pRB51c erzeugt. Ausgehend von diesen Vorstufen sollte in weiteren Versuchen durch Umsetzen des 5,1 kb großen Xho I / BamH I-Fragments in das Konstrukt pRB39 der Vektor pRB52 konstruiert werden. Nach dem Umsetzen des 6,2 kb großen Xho I / Sac I-Fragments in den DI9c-Gesamtklon sollte dann das Konstrukt pRB53 gebildet werden. Versuche, diese Strategie in die Tat umzusetzen, blieben erfolglos. Offenbar ist das gewünschte Konstrukt in Bakterien nicht stabil.

#### **3.4.4 Insertion antiapoptotischer Proteine**

Das bicistronische cDNA-Konstrukt bietet auch die Möglichkeit, Fremdsequenzen in ein Pestivirusgenom zu integrieren, ohne die viralen Gene negativ zu beeinflussen. Dadurch lassen sich Pestiviren zur Expression fremder Gene nutzen. Diese Möglichkeit erlaubt Ansätze zur Untersuchung unterschiedlicher Fragen zur Virusbiologie.

Die Lyse der mit zp Biotypen infizierten Zellen wird durch apoptotische Prozesse eingeleitet oder zumindest begleitet (Zhang et al. 1996; Vassilev and Donis 2000; Grummer et al. 2002). Eine Koinfektion von Zellen mit nzp und dem entsprechenden zp Virus führt ebenfalls zu einer Lyse der Zellen. Damit wird die Lyse nicht durch die Anwesenheit des nzp Virus unterbunden. Durch die Insertion der Sequenzen der antiapoptotischen Proteine „Bcl2“ und „E1B“ in den Bicistronischen Vektor sollte überprüft werden, ob diese Proteine die Zerstörung der infizierten Zellen verhindern können.

Das Adenovirus-E1B-Protein („adenovirus early antigen 1B“) ist ein in Adenovirus infizierten Zellen exprimiertes virales Protein, das regulatorische Funktionen im viralen Lebenszyklus übernimmt. Das erste adenovirale Gen, das exprimiert wird, ist das E1A-Gen. Die Expression dieses „immediate early“-Gens wird von zellulären Transkriptionsfaktoren gesteuert. Es spielt eine Rolle bei der Aktivierung der Transkription der späteren frühen (delayed early) Gene E1B, E2A, E2B, E3 und E4. Die E1B-, E2- und E4-Genregionen codieren für Proteine mit essentiellen regulatorischen Funktionen. Die Expression von E1B

unterdrückt durch Komplexbildung mit E1A die frühe Genexpression, die sonst kontinuierlich weiterlaufen würde und somit vor der Fertigstellung neuer Viruspartikel den Zelltod auslösen würde. Gleichzeitig schützt E1B die virale und zelluläre DNA vor dem Abbau. Die zelluläre RNA-Translation wird gehemmt, wohingegen die späte (late) virale Genexpression durch eine Kombination der Genfunktion von E1B und E4 beschleunigt wird. Wichtig für die im Folgenden beschriebenen Ansätze ist, dass das E1B einen zur Bcl2-Familie gehörenden, potenten Inhibitor der zellulären Apoptose darstellt. Der antiapoptotische Mechanismus beruht auf der Bindung pro-apoptotischer Proteine. Eine Hemmung der Apoptose in zp-BVDV infizierten Zellen durch E1B würde Hinweise auf den Mechanismus der BVDV induzierten Apoptose geben. Die Sequenz die für E1B kodiert wurde mit Hilfe der Enzyme EcoR I und Hind III aus seinem Expressionsvektor isoliert und über dieselben Schnittstellen in das Konstrukt pRB39 (siehe 3.4.1) inseriert. Ausgehend von diesem Konstrukt wurde ein Sac I / Xho I-Fragment isoliert, das das N<sup>pro</sup>-Gen, das E1B-Gen, die EMCV-IRES und ein NS3 kodierendes Fragment enthält. Dieses Fragment wurde in den infektiösen DI9c-Klon inseriert.

Das resultierende, als pRB48 bezeichnete Konstrukt diente als Matrize für die Transkription einer RNA, die sich nach ivTs und DEAE-Transfektion in zuvor mit dem Virus NCP7 infizierten Zellen als nicht lebensfähig erwies. Die Überprüfung mittels Elektroporation bestätigte das zuvor erhaltene Ergebnis, dass diese RNA nicht autonom repliziert. In Zellen, die mit RNA des pRB48 transfiziert wurden, konnte in der indirekten Immunfluoreszenz mit dem monoklonalen Antikörper „Code 4“ das Nichtstrukturprotein NS3 nicht nachgewiesen werden. Dieser Nachweis sollte als Bestätigung für die selbständige Replikation dieses Konstrukts dienen.



**Abb.27: Schematische Darstellung des pRB48.**

Neben viralen Apoptose-hemmenden Proteinen sind natürlicherweise auch in der Zelle Faktoren mit vergleichbarer Funktion enthalten. Dazu gehören die Proteine der Bcl2-Gruppe, die sowohl Repressoren wie auch Induktoren der Apoptose beinhaltet. Das Proto-Oncogen Bcl2 selbst ist ein Repressor apoptotischer Vorgänge. Dieses Protein ist zwischen 24 und 26 kD groß und ist auf der Oberfläche der mitochondrialen Membran lokalisiert. Dort bildet es mit sich selbst Homodimere, kann aber auch z.B. mit dem ebenfalls zur Bcl2-Familie gehörenden Bcl-XL Heterodimere ausbilden. Diese Homo- bzw. Heterodimere sind dann in der Lage, pro-apoptotische Proteine zu binden und die Autolyse zu unterbinden. Nehmen die pro-apoptotischen Eiweiße jedoch überhand, geht die Zelle zugrunde, indem diese pro-apoptotischen Moleküle sich in der Mitochondrienmembran zusammenlagern und Poren bilden. Dies führt zur Freisetzung des Cytochroms C und weiterer pro-apoptotischer Proteine. Das Cytochrom C wiederum führt nach der Interaktion mit weiteren pro-apoptotischen Molekülen zur Aktivierung der Caspase-Kaskade.

Zur Überprüfung des Einflusses des Bcl2 auf die von BVDV induzierte Apoptose sollte wie beim E1B ein bicistronisches Genom mit der Fähigkeit, Bcl2 zu exprimieren hergestellt werden. Es wurde dazu analog verfahren, wie für pRB48 beschrieben. Allerdings erfolgte die Insertion des Bcl2 kodierenden DNA-Fragments in den Vektor pRB39 mit Hilfe der Endonuklease EcoR I. Da die Spaltung mit nur einem Enzym durchgeführt wurde, musste die Orientierung des inserierten Fragments in den rekombinanten Plasmiden überprüft werden. Das Produkt mit dem falsch orientierten Insert wurde jedoch nicht verworfen, sondern diente als negative Kontrolle für die nachfolgenden Experimente. Das weitere Verfahren zum Umsetzen der Fragmente, die das Bcl2-Gen zusammen mit der IRES, der N<sup>pro</sup>- und NS3 kodierenden Sequenzen enthalten, verlief analog zu demjenigen, welches bei der Konstruktion des DI9c/E1B-Klons angewendet wurde. Das Konstrukt mit dem Bcl2 in richtiger Orientierung trug die Bezeichnung pRB47. Der Klon mit der Sequenz für das Bcl2 in falscher Orientierung wurde pRB47b benannt. Im Bcl2 Gen sind Schnittstellen für Sma I und Srf I vorhanden. Da eine dieser Schnittstellen für die Linearisierung des Gesamtklons vor der ivTs verwendet werden muss, ist nur durch partielle Spaltung eine Matrize für die *in vitro* Transkription

herstellbar. Bisher ist es jedoch nicht gelungen, diese Vorlage in ausreichender Menge zu generieren. Es müssen deshalb weitere Versuche, ggf. basierend auf anderen Strategien, durchgeführt werden, die aber den Rahmen der vorliegenden Arbeit überschritten hätten.



**Abb. 28: Schematische Darstellung des pRB47**

## 4. Diskussion

Das ca. 12,3 kb lange, einzelsträngige RNA-Genom der Pestiviren enthält einen einzigen offenen Leserahmen, der beiderseits von nicht kodierenden Sequenzen flankiert wird und für ein Polyprotein von etwa 4000 Aminosäuren kodiert (Collett et al. 1988a; Meyers, Rümenapf, and Thiel 1989a ;Moormann et al. 1990; Deng and Brock 1992). Eine in der 5'-nichtkodierenden Region lokalisierte interne Ribosomen-Bindestelle („internal ribosomal entry site“, IRES) vermittelt die Initiation der Translation (Poole et al. 1995; Rijnbrand et al. 1997). Schon während der Translation beginnt die Prozessierung des entstehenden Polyproteins durch wirtszell- und viruskodierte Proteasen (Rümenapf et al. 1993; Stark et al. 1993; Tautz et al. 1997; Xu et al. 1997; Collett et al. 1988b; Collett, Anderson, and Retzel 1988c; Rümenapf et al. 1998).

Die erste Spaltung des Polyproteins findet zwischen dem Nichtstrukturprotein N<sup>pro</sup> und dem Kapsidprotein (C) statt. Die Spaltung erfolgt autokatalytisch durch die proteolytische Aktivität des N<sup>pro</sup> und erzeugt somit den N-Terminus des nachfolgenden Kapsidproteins (C). Nach Translokation der anschließenden Strukturglykoproteine E<sup>rns</sup>, E1 und E2 in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) spalten zelluläre Signalpeptidasen zwischen C/E<sup>rns</sup> und E1/E2 (Rümenapf et al. 1993). Die Spaltung zwischen E<sup>rns</sup> und E1 könnte ebenfalls durch die Signalpeptidase erfolgen, allerdings fehlen Teile des erforderlichen Sequenzmotivs, so dass weitere Untersuchungen diese Frage klären müssen (Rümenapf et al. 1993). Auf das letzte Strukturprotein E2 folgen im viralen Polyprotein die Proteine p7, NS2/3 (p125), NS4A (p10), NS4B (p30) und NS5 (p130). Die Spaltung am Aminoende des p7 wird von Signalpeptidasen ausgeführt. Der Aminoterminus des auf p7 folgenden Proteins NS2/3 wird ebenfalls durch Signalpeptidasen erzeugt. Das NS3 weist Proteaseaktivität auf und bewirkt die Prozessierung aller C-terminal von NS2/3 folgenden Nichtstrukturproteine (Wiskerchen and Collett 1991; Tautz et al. 1997; Xu et al. 1997).

Das NS2/3 selber wird ebenfalls gespalten, so dass die Proteine NS2 und NS3 entstehen. Dieser Prozess ist interessant, da er bei den verschiedenen Pestiviren in unterschiedlicher Weise erfolgt. Viele BDV und BVDV-Isolate prozessieren NS2/3 nur kurz nach der Infektion und regulieren die

Prozessierung dann herunter. Andere BDV und BVDV sowie alle CSFV zeigen dagegen eine über den gesamten Infektionszeitraum mehr oder weniger konstant verlaufende Prozessierung. Bei letzteren BDV und BVDV Isolaten konnte interessanterweise durch Genomanalysen gezeigt werden, dass sie häufig Genomveränderungen aufwiesen, die auf Rekombinationen zurückzuführen sind. So wurde gefunden, dass die RNAs dieser Viren spezifische Veränderungen in der NS2/3 kodierenden Region aufweisen. Es ließen sich folgende Typen von Genomveränderungen identifizieren: (1) Insertionen zellulärer Sequenzen, (2) Duplikationen viraler Sequenzen, (3) Insertion einer viralen Sequenz in einem anderen Leseraster und (4) Deletionen (Meyers and Thiel 1996). In diesen Fällen handelt es sich um Veränderungen, die die Folge von RNA-Rekombinationen darstellen. Der BVDV Stamm-Oregon, ein Virus, das ebenfalls kontinuierliche NS2/3 Spaltung zeigt, weist wie auch die analogen Stämme Singer, Lamspringe und Danmark keine durch RNA-Rekombination hervorgerufene Genomveränderung auf. Dennoch führt die Infektion von Zellen mit BVDV Oregon zur Expression von NS3. Es wurde nachgewiesen, dass die NS2/3-Spaltung beim BVDV Oregon die Folge einer Reihe von Punktmutationen im NS2 ist (Kümmerer 1997; Kümmerer, Stoll, and Meyers 1998). Im Falle der BVDV Singer und Lamspringe sind offensichtlich andere AS als beim BVDV Oregon für die Induktion der Spaltung verantwortlich. Dies zeigt, dass verschiedene Kombinationen von Austauschungen die Spaltung des NS2/3 bewirken können. Daher ist anzunehmen, dass die Konformation des NS2-Proteins und nicht seine Primärsequenz für die NS2/3-Prozessierung entscheidend ist.

Die Prozessierung des NS2/3 wird bei verschiedenen Pestiviren von unterschiedlichen Proteasen durchgeführt. Bei BVDV, die NS3 als Folge von Rekombinationen exprimieren, sind zelleigene Proteasen beschrieben worden, die die durch Rekombination eingeführten zellulären Sequenzen erkennen und spalten. Ein Beispiel ist die Insertion von Ubiquitin in das Polyprotein des Stammes Osloss und die Spaltung zwischen Ubiquitin und NS3 durch „Ubiquitin-C-terminal-hydrolases“ (UCHs). In anderen Fällen hat die inserierte Sequenz selber Proteaseaktivität und sorgt für die Prozessierung. Dagegen ist in vielen anderen Fällen wie z.B. BVDV Stamm Oregon und Stamm CP7 nicht

geklärt, welche Protease für die andauernde Spaltung von NS2/3 verantwortlich ist.

Für die Antwort auf die Frage, welche Protease NS2/3 in den zuletzt beschriebenen Fällen spaltet, kann es hilfreich sein, die Daten von verwandten Viren zu betrachten. Analysen von Vertretern des Genus Flavivirus zeigten, dass die Spaltung zwischen NS2 und NS3 durch eine virale Protease erfolgt. Diese Viren, die eine den Pestiviren ähnliche Genomorganisation besitzen, weisen im Nichtstrukturproteinbereich ein NS3-Protein mit Serinproteaseaktivität auf (Wengler et al. 1991). Bei Flaviviren erfolgt im Unterschied zu den Pestiviren eine vollständige Spaltung zwischen NS2 und NS3. Zudem wird bei Flaviviren das NS2 weiter in NS2A und NS2B prozessiert (Rice 1996). Das NS2B bildet mit NS3 einen stabilen Komplex, die sogenannte NS2B/3-Protease (Chambers et al. 1993). Das N-terminale Drittel von NS3 enthält hierbei die katalytische Serinproteasedomäne der NS2B/3-Protease. Für das beteiligte NS2B wird eine „Chaperon“-Funktion für die korrekte Faltung des NS3 diskutiert (Arias, Preugschat, and Strauss 1993). Diese NS2B/3-Protease erzeugt die N-Termini der Nichtstrukturproteine NS2B, NS3, NS4A, 2K und NS5 (Rice 1996).

Hepatitis C-Viren (HCV) weisen, was die Zahl, Größe, Genomlokalisierung und auch die Funktion(en) der Prozessierungsprodukte des viralen Polyproteins betrifft, größere Ähnlichkeiten mit den Pestiviren auf als die Flaviviren (Grakoui et al. 1993c; Meyers et al. 1994). In Analogie zu den Pestiviren findet man Proteine, die als NS2 bzw. NS3 bezeichnet werden. Das NS3-Protein stellt ebenfalls eine Serinprotease dar, die an der Freisetzung aller C-terminal von NS3 gelegenen Nichtstrukturproteine beteiligt ist, mit NS4A als Cofaktor. (Grakoui et al. 1993b; Grakoui et al. 1993c; Failla, Tomei, and De Francesco 1995). Wie bei den Flaviviren erfolgt die Spaltung zwischen NS2 und NS3 vollständig, wird im Gegensatz jedoch nicht von der NS3-Protease vollzogen (Bartenschlager et al. 1993; Tomei et al. 1993). Weitere Untersuchungen führten zur Identifizierung einer zweiten HCV-Protease, der sogenannten NS2/3-Protease, die nicht mit der NS3-Protease identisch ist. Die NS3-Protease umfasst ausschließlich das N-terminale Drittel von NS3, während die NS2/3-Protease aus dem C-terminalen Anteil von NS2 und den etwa 180 N-terminalen

AS von NS3 besteht. Die katalytische Triade der NS3-Serinprotease ist im N-terminalen Drittel von NS3 lokalisiert, wohingegen das für die katalytische Aktivität der NS2/3-Protease wichtige Aminosäuremotiv, welches aus einem Histidin und einem Cystein besteht, im C-terminalen Anteil des NS2 lokalisiert ist (Grakoui et al. 1993a; Hijikata et al. 1993).

Wie beim HCV als auch bei BVDV Oregon und CP7 ist die NS3-Protease nicht an der Spaltung zwischen NS2 und NS3 beteiligt (Kümmerer, Stoll, and Meyers 1998). Da eine nahe Verwandtschaft zwischen HCV und Pestiviren bezüglich der Nichtstrukturproteine vorliegt, wurde vermutet, dass analog zu HCV auch bei Pestiviren eine der NS2/3-Protease entsprechende enzymatische Aktivität vorhanden ist. Diese Vermutung konnte erst kürzlich für BVD Viren bestätigt werden. Die identifizierte Protease, die den C-Terminus des NS2 und das Aminoende des NS3 umfasst, ist in der frühen Phase der Infektion bei allen BVDV aktiv und wird im weiteren Verlauf bei vielen Vertretern dieser Spezies herunterreguliert (Lackner et al. 2004).

Eine attraktive Hypothese ist, dass bei solchen BVDV, die NS2/3 dauerhaft spalten, ohne dass bisher eine dafür verantwortliche Protease identifiziert werden konnte, diese Regulation gestört ist und somit die Prozessierung fortgesetzt erfolgt. Diese Hypothese passt gut zu den Befunden, dass offensichtlich nur geringfügige Veränderungen wie die Punktmutationen beim Stamm Oregon nötig sind, um die permanente Spaltung zu erreichen.

Die Prozessierung des NS2/3 bei Pestiviren ist besonders bei BVDV, wie oben beschrieben, ein hochkomplexer Vorgang. Die Frage der NS2/3 Spaltung hat weitgehende Folgen für die Biologie von BVDV. Viren dieser Spezies, die fortgesetzte Prozessierung des NS2/3 oder auch nur ständige Expression des NS3 zeigen, gehören dem zp Phänotypen an, während solche, die diesen Schritt regulieren können, ihre Zielzellen nicht zerstören. Im Gegensatz dazu replizieren CSFV und manche BDV trotz andauernder NS2/3 Spaltung ohne Lyse in ihren jeweiligen Wirtszellen. Diese Diskrepanz ist interessant und bedarf weiterer Untersuchungen. Da sich zytopathogene Vertreter der zuletzt genannten Virusgruppe dadurch auszeichnen, dass sie deutlich mehr NS3 exprimieren als die nzp Stämme, wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine Korrelation zwischen der Menge an exprimiertem NS3 in der Zelle und dem Phänotyp besteht. Diese Hypothese war der Ausgangspunkt für wesentliche

Teile der Experimente, die im Rahmen der vorliegenden Dissertation durchgeführt wurden.

Zunächst wurde die Effizienz der NS2/3 Spaltung bei verschiedenen Wildtyp CSFV Stämmen bestimmt. Die Werte bewegten sich zwischen 39 und 67 %. Diese Spalteffizienzen sind geringer als bei zp BVDV und könnten somit ein Hinweis auf die Richtigkeit der Hypothese sein. Interessanterweise korreliert die Spalteffizienz mit der Virulenz der untersuchten Wildtypisolate. Hochvirulente Stämme wie Brescia (67 %) und Eystrup (56 %) zeigen eine hohe NS3-Expression, während sich bei weniger virulenten Stämmen wie Alfort (39 %) und Glentorf (42 %) oder dem apathogenen Impfvirus Riems eine deutlich geringere Spalteffizienz nachweisen lässt. Aus dieser Reihe fällt lediglich das apathogene Virus Iffa heraus, das mit 60 % eine hohe Spalteffizienz zeigt. Keines der angesprochenen Viren gehört trotz konstitutiver NS3 Expression zum zp Biotyp. Dies ist bemerkenswert, da bei BVDV Oregon Spalteffizienzen oberhalb von 60 % eindeutig zu einem ZPE führen. Damit ist gezeigt, dass die Spalteffizienz alleine nicht ausschlaggebend für den Phänotyp des Virus sein kann.

Zur Untersuchung der Bedeutung der Sequenz an der Spaltstelle des NS2/3 wurden Mutanten erzeugt und auf ihre Lebensfähigkeit sowie die Spalteffizienz hin untersucht. Lebensfähig waren nur drei der untersuchten 13 CSFV Mutanten. Tolerierbar erschienen Veränderungen direkt an der Spaltstelle im NS2/3. Zum einen war dies die Mutante 64 mit dem Austausch des Arginin an P1 gegen Histidin. Beide Aminosäuren gehören zwar in die Gruppe der basischen Aminosäuren, doch ist das Histidin nur schwach basisch und zudem kleiner als das Arginin. Trotz dieser Unterschiede scheint die Funktion des Proteins nicht wesentlich beeinträchtigt zu werden. Die beiden anderen lebensfähigen Mutanten trugen die Bezeichnung Mut 45 und Mut 46. Substituiert wurde hier die erste Aminosäure (P1') des NS3-Proteins Glycin gegen Serin bzw. Alanin. Bei beiden Substituenten handelt es sich wie beim ursprünglich vorhandenen Glycin auch um kleine Aminosäuren. Ein Austausch des Glycin gegen größere Aminosäuren hingegen scheint letal zu sein. Dies ist ein Hinweis darauf, dass an dieser Position die Größe der Aminosäure ausschlaggebender für die Funktion ist als ihr Charakter, denn Glycin, Serin

und Alanin haben deutlich unterschiedliche chemische Eigenschaften. Viren mit den Substituenten Prolin und Asparaginsäure an P1' des CSFV-Proteins waren nicht lebensfähig. Offenbar verändern diese Substitutionen die Struktur der Spaltstelle dermaßen, dass entweder die Spaltung nicht mehr in ausreichendem Maße möglich ist, oder die Funktion des NS3-Proteins eingeschränkt wird. Hierfür spricht zum einen, dass bei der Substitution durch Prolin nur Revertanten auftraten, während beim Substituenten Asparaginsäure keine lebensfähigen Viren detektiert werden konnten. Ferner könnte auch ein Einfluss auf die Struktur des NS2/3-Proteins denkbar sein. So ist Prolin durch seine Ringstruktur häufig in Knicken gefalteter Proteinketten zu finden.

Alle weiteren überprüften Veränderungen des Spaltstellenbereichs waren entweder letal oder nicht stabil. Bei den neun nachgewiesenen Revertanten scheint der Eingriff in die Proteinstruktur dermaßen umfangreich zu sein, dass eine uneingeschränkte Replikation nicht möglich und somit eine „Reparatur“ notwendig ist. Das Zurücksetzen in den ursprünglichen Zustand macht deutlich, wie empfindlich das System „Virus“ auf die Veränderungen an der Spaltstelle „reagiert“. Leider gelang es im Rahmen dieser Arbeit nicht, für alle Mutanten die NS2/3-Spalteffizienz zu bestimmen. Es fällt jedoch auf, dass die stabilen Mutanten R-P1-H, G-P1'-A und G-P1'-S Wildtyp-Spalteffizienzen zeigten. Es ist damit gut vorstellbar, dass die Mutanten, die revertieren oder gar nicht lebensfähig sind, deutlich veränderte Spalteffizienzen zeigen und dies die Ursache für Reversion oder Nicht-Lebensfähigkeit ist.

Neben der Mutante M44 (G-P1'-D) konnten drei weitere untersuchte Mutanten (M59, M60 und M61) in der Zellkultur weder mittels RT-PCR noch IF nachgewiesen werden. Die eingeführten Veränderungen scheinen demnach die Funktion der kodierten Proteine dermaßen zu stören, dass selbst die wenigen Replikationszyklen, die zur Reversion notwendig wären, nicht möglich sind.

Im Gegensatz zu den Versuchen mit CSFV wurde bei den Spaltstellenmutanten des BVDV Oregon keine einzige Variante gefunden, die nicht revertierte. Mutanten wie M45 oder M57, die wildtypähnliche Prozessierung zeigten, konnten zwar als infektiöse Gesamt-cDNA-Klone erhalten werden, revertierten jedoch innerhalb weniger Passagen. Ein direkter Vergleich der Systeme CSFV und BVDV Oregon ist nur im Fall der Mutante M45 möglich. Während im CSFV-

System diese Mutante zu lebensfähigen Viren führte, revertierte das analoge Virus des BVDV Oregon. Interessant ist auch, dass die Mutante M44 (G-P1'-D) beim BVDV Oregon problemlos revertieren konnte, während die Transfektion der entsprechend veränderten CSFV-RNA nie zu infektiösen Viren oder zum Nachweis von RNA-Replikation führte.

Die Beobachtung, dass CSFV Mutanten mit Veränderungen an P1' der Spaltstelle (M45 und M46) lebensfähig sind, ist bemerkenswert, denn es gibt Hinweise darauf, dass diese Sequenz funktional wichtig ist. Obwohl das NS3 bei zp BVDV auf vielfältige Weise entstehen kann, beginnen die NS3-Proteine aller bisher untersuchten BVDV am Aminoterminus mit Glycin 1590. Da dies auch bei BVDV Oregon der Fall ist, kann diese Konservierung nicht, wie lange vermutet wurde, Folge der RNA-Rekombination sein, denn dieses Virus enthält in seinem Genom keine durch Rekombination hervorgerufene Veränderung. Tautz und Thiel haben gezeigt, dass geringe Veränderungen am NS3-Aminoterminus letal für ein BVDV sind (Tautz and Thiel 2003). Einer der funktionalen Gründe für die Konservierung könnte in der Interaktion mit dem NS4A zu finden sein. NS4A dient als Co-Faktor der NS3-Protease. Die Bindung des NS4A erfolgt am N-Terminus des NS3, so dass eine Veränderung dieses Bereichs die Bindung beeinträchtigen und in Folge dessen die Virusreplikation nachhaltig stören könnte. Die Mutanten G→A und G→S scheinen beim CSFV Alfort/Tübingen die Funktion des NS3 nicht zu beeinträchtigen, wohl aber beim BVDV Oregon. Es gibt aber auch bei BVDV Hinweise auf eine gewisse Flexibilität in Bezug auf den Beginn des NS3-Proteins. Für das DI des BVDV CP13 wurde beschrieben, dass der N-Terminus des NS3 durch die Rekombination verändert wurde. Die ersten 5 Kodons des NS3 Gens wurden deletiert. Zudem wurden an das trunkierte Ende 10 Kodons aus der E1 kodierenden Sequenz und 13 Kodons des N<sup>pro</sup>-Gens angefügt (Kupfermann et al. 1996). Analysen mit infektiösen cDNA-Konstrukten zeigten, dass die zusätzlichen AS am Aminoterminus des NS3 erforderlich sind, um den Verlust der ursprünglich vorhandenen Aminosäuren zu kompensieren (Meyers, nicht veröffentlicht).

Betrachtet man die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhaltenen und die publizierten Ergebnisse, dann fällt auf, dass es einige Unterschiede zwischen

CSFV- und BVDV-Isolaten gibt. In beiden Fällen wird NS3 konstitutiv während des Infektionszyklus' gebildet, ohne dass eine durch Rekombination entstandene Genomveränderung vorläge. Im Gegensatz zu CSFV scheint das BVDV aber in der Lage zu sein, bestimmte letale Veränderungen durch Reversion beheben zu können, die bei CSFV offensichtlich die RNA-Replikation blockieren. Andererseits ist CSFV imstande, mit NS2/3 Spalteffizienzen zu existieren, die beim Oregon letal sind oder durch Reversion bzw. Pseudoreversion so verändert werden, dass wieder Spalteffizienzen von mehr als 60 % erreicht werden (Kümmerer and Meyers 2000). Der entscheidende Unterschied ist aber, dass im Falle von BVDV die unkontrollierte Freisetzung von NS3 in jedem Fall zum ZPE führt, während CSFV trotz NS2/3-Spaltung die Wirtszellen nicht zerstört. Wie bereits diskutiert, könnte dies eine Folge unterschiedlicher NS3-Mengen sein.

Erst kürzlich wurde beschrieben, dass alle BVDV, auch solche, die keinen ZPE ausbilden, NS3 exprimieren. Trotz dieser Befunde bleibt festzuhalten, dass es bei allen natürlich vorkommenden zp BVDV eine direkte Korrelation zwischen der unkontrollierten Freisetzung des NS3 und dem zp Typ gibt. NS3 wurde deshalb lange als zytopathogenes Agens diskutiert und es ist naheliegend, anzunehmen, dass NS3 an der Entstehung des ZPE beteiligt ist. Ein direkter Nachweis für einen ursächlichen Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von NS3 in den infizierten Zellen und deren Lyse fehlt jedoch noch. Unklar ist auch, welcher Mechanismus einer durch NS3 ausgelösten Zytopathogenität zu Grunde liegt. Ein Hinweis könnte die Antwort auf die Frage sein, welcher Unterschied zwischen NS2/3 und NS3 besteht, da NS2/3 alle Sequenzen beinhaltet, die im NS3 zu finden sind. Möglich wäre eine Differenz in der enzymatischen Aktivität der NS3-Protease oder Helikase zwischen NS2/3 und NS3. Hierbei könnte der kovalent gebundene NS2-Anteil im NS2/3 regulierend auf die enzymatische(n) Aktivität(en) wirken. Für die im NS3 lokalisierte Protease wäre vorstellbar, dass eine gegenüber dem NS2/3 veränderte Aktivität die (vermehrte) Spaltung zellulärer Proteine und damit eine Zellschädigung zur Folge haben könnte.

Eine weitere Möglichkeit wäre ein Einfluss auf die Regulation der Virusreplikation. Unterschiede in der Prozessierung der Nichtstrukturproteine

könnten Auswirkungen auf die RNA-Syntheserate haben. Im Allgemeinen ist die Ausbeute an viraler RNA aus zp-BVDV infizierten Zellen höher als aus nzp-BVDV infizierten Zellen. Dennoch scheint kein direkter Zusammenhang zwischen einer erhöhten Rate der Genomreplikation und der Zytotoxizität zu bestehen (Qu, McMullan, and Rice 2001). So zeigen auch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen, dass NCP7 infizierte Zellen mehr virale RNA enthalten als CP7 infizierte Zellen.

Alternativ zu einem direkten regulierenden Einfluss des NS2 auf das NS3 könnte sich eine bestimmte zelluläre Lokalisation des NS2-Anteils im NS2/3 regelnd auswirken. NS2 besitzt einen stark hydrophoben Charakter. Es gibt Hinweise, dass NS2 und NS2/3 membranassoziierte Proteine sind, wohingegen NS3 als hydrophiles Protein hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert ist. Eine derartige Verteilung dieser Proteine konnte für HCV gezeigt werden und auch für BVDV gibt es entsprechende Daten (Santolini et al. 1995; Zhang, Flick-Smith, and McCauley 2003). Es ist vorstellbar, dass freies NS3 im Zytoplasma zelluläre Substrate umsetzt, zu denen ein vermutlich in Form eines Replikasekomplexes membrangebundenes NS2/3 keinen Zugang hat. Weiterhin könnte eine Membranassoziation die Faltung des Proteins und damit seine Aktivität beeinflussen.

Ob NS3 selbst einen potentiellen toxischen Effekt auf die Zelle ausübt oder ob es als Intermediat einer Reaktionskette fungiert, an dessen Ende ein toxisches Produkt entsteht, ist noch nicht geklärt. Untersuchungen zeigten, dass die Infektion von Kulturzellen mit zp BVD-Viren zur Induktion von Apoptose führt (Schweizer and Peterhans 1999; Vassilev and Donis 2000; Grummer et al. 2002). In zp-BVDV infizierten Zellen konnte die für den programmierten Zelltod typische DNA-Fragmentation und das „Shiften“ der Zellmembran durch AnnexinV-Assays nachgewiesen werden. Dieser Effekt konnte in mit nzp BVD-Viren infizierten Zellen nicht beobachtet werden. Nichtzytotoxische BVDV verursachen keine Apoptose, obwohl auch hier doppelsträngige RNA in der infizierten Zelle vorliegt, die normalerweise als Signal für die Auslösung von Apoptose dient (Schweizer and Peterhans 2001). Das NS2/3 könnte hier mit einem zellulären Faktor interagieren, um die Apoptose zu verhindern. Sollte

dies der Fall sein, müsste das NS3 in mit zp BVD infizierten Zellen diese Funktion des NS2/3 hemmen, da es bei einer Simultaninfektion von Zellen mit zp und nzp BVD ebenfalls zu einer Ausbildung des ZPE kommt.

Die verschiedenen experimentellen Befunde stellen aber in Frage, dass das NS3 der alleinige Auslöser des ZPE und damit der Apoptose ist. Besonders wichtig für die Untersuchung dieses Aspekts waren Arbeiten, bei denen erstmals konstitutiv NS3 exprimierende, nichtzytopathogene BVD-Viren vom Stamm NADL nachgewiesen wurden (Qu, McMullan, and Rice 2001). Ausgangspunkt zu diesen Experimenten war ein bicistronisches BVDV auf Basis des Stammes NADL, das zusätzlich das Gen für die Puromycin-Acetyltransferase (pac) als Selektionsmarker trug. In biologischen Tests wie der Überprüfung der Plaquemorphologie, der Wachstumskinetik und der Zytopathogenität verhielt sich das aus diesem Konstrukt erzeugte Virus wie das Wildtypvirus NADL. Durch Zugabe des Antibiotikums Puromycin zum Zellkulturmedium konnten nzp NADL BVDV selektioniert werden. Entgegen den Erwartungen zeigte die nzp NADL Variante in den Genabschnitten, die für NS2 oder NS3 kodieren, keine Veränderungen. Dagegen wurde überraschenderweise eine Mutation im Genbereich des NS4B identifiziert. Die das NS4B betreffende Abweichung stellt eine Substitution des Tyrosin 2441 im Polyprotein des BVDV NADL durch Cystein dar. Die Einführung dieser Mutation in das natürliche zp Virus NADL lieferte das gleiche Ergebnis: Das ursprüngliche zp Virus wurde in ein nzp Virus transformiert (Qu, McMullan, and Rice 2001).

Die Stelle im NS4B, an der diese Veränderung vorgenommen wurde, ist bei allen Pestiviren sehr konserviert. Um zu überprüfen, welche Auswirkungen die Substitution des Tyrosins bei anderen Pestiviren hat, wurden entsprechende Mutanten für BVDV CP7, -NCP7, NewYork und CSFV Alfort/Tübingen etabliert. Die daraus folgenden Viren mit einer Mutation im NS4B-Protein zeigten in Abhängigkeit von ihrem zugehörigen Wildtypvirus verschiedene Veränderungen im Wachstum. Mutanten, die von einem nzp Virus abgeleitet wurden, zeigten keine offensichtlichen Veränderungen ihrer Eigenschaften in der Zellkultur. Das veränderte Mut-NS4B-CP7-Virus hingegen induzierte im Gegensatz zu seinem zugehörigen Wildtypvirus keinen ZPE in den Zellen. Diese nzp Variante des CP7 produzierte etwas mehr virale RNA, jedoch 13 % weniger NS3 als das

ursprüngliche CP7-Virus. Verglichen mit dem NCP7-Wildtyp, der NS3 nicht unkontrolliert freisetzt, exprimiert diese Mutante wesentlich mehr NS3 und annähernd gleich viel RNA. Damit scheint der in der Literatur diskutierte Zusammenhang zwischen zp Phänotyp und der Effizienz der RNA Synthese nicht zu bestehen. Dagegen könnte die Menge an NS3 in der infizierten Zelle mit dem zp Phänotyp von BVDV korreliert sein, denn der gemessene Wert für das Mut-NS4B-CP7 liegt mit 50 % unter dem Bereich, der bei BVDV Oregon für den Phänotyp erforderlich zu sein scheint (Kümmerer and Meyers 2000). Weitere Mutanten mit anderen Aminosäureaustauschen an der Position 2360 waren nicht lebensfähig (PD Dr. G. Meyers, persönliche Mitteilung). Die Mutation im NS4B verhindert generell die Zytopathogenität von BVDV, ohne die Expression von NS3 zu blockieren. Das NS4B kann somit als Modulator des durch BVDV CP7 bedingten ZPE angesehen werden und entkoppelt die ZPE-Induktion von der NS3-Produktion.

Über die Funktion des membranassoziierten NS4B bei der Replikation der Hepaci- und Pestiviren ist wenig bekannt, so dass auch die Rolle des Y2360 derzeit fraglich ist. Diskutiert wird die Integration des NS4B in die Membran mit partieller Präsenz im Lumen des ER, während die durch die Protease NS3-NS4A generierten Termini (Amino- und der Carboxy-Terminus des NS4B) in das Zytoplasma der Zelle ragen (Tautz et al. 1997; Xu et al. 1997). Die veränderte Aminosäure Y2360 befindet sich im N-terminalen Bereich und wäre somit im Zytoplasma lokalisiert. Hier könnten Interaktionen zwischen dem NS4B und viralen oder zellulären Faktoren auf der dem Zytoplasma zugewandten Seite der ER-Membran ablaufen. Diese Abläufe könnten in die Modulation der durch BVDV bedingten Zytopathogenität involviert sein. Durch die Gegenwart von NS4B-Domänen sowohl im Zytosol wie auch im Lumen des ER könnte dieses Protein ein „Vermittler“ und „Koordinator“ für Vorgänge in und zwischen beiden Kompartimenten sein. Beispiel für solche Interaktionen ist das NS4A der Flaviviren. Das Flavivirus-NS4A-Protein, welches wie das NS4B der Pestiviren und des HCV vermutlich Transmembrandomänen enthält, vermittelt direkt oder indirekt die Funktion des NS1-Proteins der Flaviviren. Das sekretierte, glykosylierte NS1-Protein spielt dort eine Rolle in der frühen Phase der Minus-Strang-RNA-Synthese (Lindenbach and Rice 1999).

Bisher war die konstitutive Expression des NS3 bei BVDV stets mit Zytotoxizität verbunden. Die Tatsache, dass eine einzige Mutation im NS4B diesen Phänotyp unterbindet, lässt mehrere Vermutungen zu. Sollte das NS3 der Auslöser des ZPE und des damit verbundenen Zelltods sein, dann könnte das NS4B ein für diesen Mechanismus notwendiger Co-Faktor sein. Das NS4B könnte direkt mit dem NS3 interagieren oder aber unabhängig davon eingreifen. „Cross-linking“-Untersuchungen lassen einen Multiproteinkomplex aus NS3, NS4B und NS5A vermuten (Qu, McMullan, and Rice 2001). Die Mutation der AS 2360 könnte so die Verbindung zwischen NS3 und NS4B inhibieren. Auch ein Einfluss auf zelluläre Komponenten, die für die NS3-abhängige Zytotoxizität benötigt werden, wäre denkbar.

Die N-terminale Region des NS4B, in der die AS 2360 lokalisiert ist, stellt einen hoch konservierten Bereich dar und unterstreicht damit ihre Wichtigkeit. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die Funktion dieses Bereichs aufzuklären und interagierende virale oder zelluläre Proteine zu identifizieren. Ein interessanter Ansatz für weitere Arbeiten könnte das die Mutation tragende Mut-NS4B-DI9c darstellen. Die davon abgeleitete RNA scheint nicht in der Lage zu sein autonom zu replizieren. Das WT-DI9 hingegen ist dazu fähig und benötigt ein nzp BVD-Helfervirus lediglich zur „Verpackung“ der replizierten RNA. Damit sollte es einen entscheidenden Unterschied zwischen NS4B im Kontext mit dem vollständigen Satz an viralen Proteinen und dem vom DI9 exprimierten Satz ohne Strukturproteine, p7 und NS2 geben. Die Identifizierung dieses Unterschieds könnte erheblich dazu beitragen, die Funktion des NS4B zu klären.

Der scheinbare Einfluss des veränderten NS4B auf die Expression des NS3 kann verschiedene Gründe haben. Direkte oder indirekte Mechanismen wie Einflüsse auf die NS2/3-Prozessierung, erhöhte Stabilität des NS2/3 oder verminderte Stabilität des NS3 durch veränderte Wechselwirkungen mit dem mutierten NS4B oder anderen, von Letzterem beeinflussten Proteinen sind denkbar.

Falls NS3 tatsächlich der ausschließliche Effektor des ZPE ist, könnte ein destabilisiertes NS3 dazu führen, dass die erzeugte Menge an NS3 nicht mehr

---

ausreicht, um zu einer Lyse der Zellen zu führen. Dies wird gestützt durch die in den Experimenten ermittelte geringere Spalteffizienz.

Die Generierung einer nzp Variante des BVDV, die NS3 exprimiert, ist für diese Virus-Spezies ungewöhnlich, nicht aber für CSFV und BDV. Bei CSFV werden zur Expression des NS3 keine Genomveränderungen beobachtet, wie sie bei BVDV für die Expression des NS3 notwendig sind. Obwohl die Menge an gebildetem NS3 in der infizierten Zelle im Vergleich teilweise weit über das Level von Mut-NS4B-CP7 hinausgeht und den Mengen bei zp BVDV z.T. entspricht, finden sich in der Regel nur nzp CSFV-Stämme. Alle bekannten zp CSFV-Stämme sind durch Genomveränderungen während der Replikation entstanden und ähneln den DIs der BVDV. Zur Abklärung, ob auch bei nzp Viren ein Einfluss durch eine Veränderung im NS4B zu beobachten ist, wurden entsprechende Mutationen auch in nzp BVD- und nzp CSF-Viren eingebracht. Signifikante Wachstumsunterschiede konnten ebenso wenig beobachtet werden wie phänotypische Abweichungen. Unterschiede ergaben sich allerdings in der Menge an gebildeter RNA, wenngleich hier kein einheitliches Verhalten zu beobachten war.

Es bleibt damit festzuhalten, dass der Mechanismus, der nach zp Pestivirus Infektion zum Zelltod führt, und der Zusammenhang zwischen diesem Vorgang und der Expression des NS3 bisher nicht geklärt sind. Offensichtlich ist jedoch unter anderem auch anhand der in der vorliegenden Arbeit ermittelten Daten, dass das NS3 nicht allein für die Induktion des ZPE verantwortlich sein kann.

Aus den bisher beschriebenen Daten lässt sich die Frage ableiten, wieso es überhaupt zp BVDV gibt. Tatsache ist, dass die meisten Viren, die im Feld isoliert werden, einen nzp Phänotyp zeigen. Diese Viren haben gegenüber zp Viren einen Verbreitungsvorteil. Während der ersten drei Monate der Trächtigkeit können diese Viren über die Plazenta den Fötus infizieren. Innerhalb dieses Zeitraums erfolgte Infektionen führen zur Induktion einer spezifischen Immuntoleranz der Föten und zur Geburt von lebenslang persistent infizierten Tieren, die das nzp Virus verbreiten können. Im Feld entstehen immer wieder zp BVD-Viren aus nzp Viren. Dies erfolgt während persistenter Infektionen und führt zum Ausbruch einer als MD bezeichneten

tödlichen Krankheit. Hierbei entsteht das erste zp Virus erst zu einem Zeitpunkt, zu dem bereits eine sehr große Zahl von nzp Viren im Organismus vorhanden ist. Trotz der Überzahl an nzp Viren lassen sich aus einem MD-Tier problemlos zp Viren isolieren. Dies deutet darauf hin, dass diese gegenüber den nzp Viren einen Wachstumsvorteil besitzen. Dieser Vorteil könnte eine direkte Folge der verbesserten Virusfreisetzung aufgrund der Zytotoxizität des Virus sein. Möglicherweise stellt die Fähigkeit zur NS2/3-Spaltung aber auch einen Vorteil für die Replikation in bestimmten Zelltypen dar. Tatsächlich gibt es Hinweise auf die Verbreitung von zp BVDV in Geweben der infizierten Tiere, die kein nzp Virus enthalten (Hewicker et al. 1990; Liebler et al. 1991; Hewicker-Trautwein et al. 1997; Liebler-Tenorio, Ridpath, and Neill 2004).

Ein interessanter Befund wurde kürzlich von (Lackner et al. 2004) publiziert. Danach benötigt das nzp Virus zur Replikation ein zelluläres Chaperon, das für die Spaltung des NS2/3 in der frühen Phase des Replikationszyklus sorgt. Ohne diese Spaltung findet keine RNA-Replikation statt. Zytotoxische Viren könnten von diesem Faktor unabhängig sein und damit in Zellen replizieren können, die dieses Zellprotein nicht oder in zu geringen Mengen exprimieren.

Pestiviren leiten sich möglicherweise von einem gemeinsamen Vorfahren ab, bei dem die Spaltung zwischen NS2 und NS3 grundsätzlich dauerhaft erfolgte. Im Folgenden könnten sich zwei unterschiedliche Gruppen von Pestiviren entwickelt haben. Einerseits die Vorläufer der heutigen CSFV und einiger BDV, bei denen die dauerhafte Freisetzung des NS3 keine Ausbildung eines ZPE zur Folge hat. Andererseits bildete sich eine weitere Gruppe von Pestiviren aus, bei denen aus bisher ungeklärten Gründen die Expression des NS3 zu einer Lyse der Zellen führt. Die Ausbildung eines ZPE ist für diese Viren jedoch als Nachteil zu werten, da sie keine lebenslang persistierende Infektion hervorrufen können und somit die Ausbreitung innerhalb der Wirtspopulation eingeschränkt wird. Infolgedessen könnten sich aus den zur Spaltung von NS2/3 befähigten zp Viren Varianten entwickelt haben, bei denen die Spaltung des NS2/3 reguliert wird und somit auch der ZPE unterbleibt. Diese Vertreter würden den heutigen nzp BVDV und nzp BDV entsprechen, die das NS2/3 nur noch kurzfristig in der ersten Phase des Replikationszyklus spalten. Die durch RNA-Rekombination bzw. Mutation wiedererlangte Fähigkeit zur NS2/3-Spaltung und

der damit verbundenen Ausbildung des zp Biotyps würde somit eher einen Rückschritt als eine vorteilhafte Entwicklung für die BVD-Viren darstellen. Die Reversion zum NS2/3 unkontrolliert spaltenden zp Virus ist nach allen vorliegenden Daten ein zufälliger Prozess. Der bereits diskutierte Selektionsvorteil des zp Virus in persistent infizierten Tieren wäre dann dafür verantwortlich, dass sich die zp Variante im Tier vehement vermehrt und schließlich in vergleichbaren Mengen vorkommt wie das nzp Virus.

Die Prozessierung am Aminoterminus des NS3 im pestiviralen Polyprotein ist eine für das Verständnis der Virusbiologie und der Rolle von BVDV als veterinärmedizinisch wichtiger Krankheitserreger wesentliche Frage. Es ist offensichtlich, dass noch erhebliche Anstrengungen unternommen werden müssen, um die komplexen Zusammenhänge zwischen Polyproteinprozessierung, Zytopathogenität und Induktion der tödlichen MD zu klären. Die vorliegende Arbeit hat zu verschiedenen Aspekten dieses Komplexes Beiträge geliefert und Ansätze für weitere Arbeiten eröffnet.

## 5. Zusammenfassung

Das Virus der bovinen viralen Diarrhöe (BVDV) und das Virus der klassischen Schweinepest (CSFV) sind umhüllte Viren, die dem Genus *Pestivirus* der Familie *Flaviviridae* angehören. Das Genom besteht aus einer einzelsträngigen RNA positiver Polarität und kodiert für ein etwa 4000 Aminosäuren langes Polyprotein, welches ko- und posttranslational in die reifen Virusproteine gespalten wird.

BVD-Viren werden aufgrund ihres Verhaltens in der Zellkultur in zytopathogene (zp) und nicht zytopathogene (nzp) Viren unterteilt. Im Vergleich mit den nzp BVD-Viren weisen die bisher analysierten zp BVD-Viren verschiedene Genomveränderungen auf, die das Ergebnis von RNA-Rekombinationsvorgängen sind. Zu diesen Veränderungen zählen: (1) Insertionen zellulärer Sequenzen, (2) Duplikationen viraler Sequenzen, (3) Insertion einer viralen Sequenz in einem anderen Leseraster und (4) Deletionen. Aufgrund dieser Genomveränderungen kommt es zur konstitutiven Expression eines für zp BVD-Viren spezifischen Proteins, des NS3, welches das carboxyterminale Spaltprodukt von NS2/3 darstellt und in nzp-Virus infizierten Zellen nur transient, im Frühstadium der Infektion auftritt. NS2/3 wird sowohl in zp- als auch in nzp-BVDV infizierten Zellen dauerhaft exprimiert. Viren der klassischen Schweinepest hingegen exprimieren sowohl das Nichtstrukturprotein NS2/3 als auch dessen Prozessierungsprodukte NS2 und NS3, ohne dass es zur Ausbildung eines ZPE kommt. Auch für das CSF-Virus konnten zp Biotypen nachgewiesen werden. Diese entstehen wie auch bei den nahe verwandten BVD-Viren durch RNA-Rekombinationsprozesse. Alle bisher bekannten zp CSFV weisen die gleiche Konstruktion auf. Es handelt sich um sogenannte defekte interferierende Partikel (DI), die denen der BVDV ähneln.

Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der NS2/3-Spaltstelle sowohl beim zp BVDV-Stamm Oregon als auch beim nzp CSFV-Stamm Alfort.

Um die Genomregion zu untersuchen, die die Information für die Spaltstelle NS2/3 trägt, wurden von beiden Viren verschiedene Mutanten erzeugt und die Spaltung des NS2/3 in NS2 und NS3 beurteilt. Im Anschluss an diese Expressionsuntersuchungen wurden die erhaltenen Viren auf ihre Lebensfähigkeit hin untersucht. Es stellte sich heraus, dass eine Veränderung der NS2/3-Spaltstelle große Auswirkung auf die Vitalität der überprüften Viren

hat. Für das BVD-Virus Stamm Oregon heißt dies, dass trotz teilweise mit dem Wildtyp vergleichbaren Prozessierungsraten keine die Mutation tragenden Viren über einen längeren Zeitraum stabil waren. Alle untersuchten Mutanten revertierten innerhalb der ersten fünf Passagen. Ein etwas anderes Verhalten zeigte sich beim untersuchten CSFV-Stamm. Hier konnten drei stabile Mutanten erhalten und analysiert werden. Erstaunlicherweise erwiesen sich Mutanten an den Positionen P1 und P1' als stabil. Dies ist insofern interessant, da in der Natur nur Viren beobachtet werden, deren Aminoterminus des NS3 durch ein Glycin dargestellt wird. In Spaltungsuntersuchungen zeigte sich darüber hinaus, dass diese Mutanten das NS2/3 in mit dem Wildtyp-Virus vergleichbaren Mengen spalten.

Bei BVDV-Feldisolaten ist die konstitutive Expression des BVDV-NS3 stets mit der Zytopathogenität korreliert. In Mutationsstudien konnte durch die Substitution eines Tyrosins durch Cystein in einem sehr konservierten Bereich des NS4B eine nzp Variante des BVDV erhalten werden, die konstitutiv NS3 in erheblichen Mengen exprimiert. Diese Variante wies die Substitution Y→C im NS4B auf. In der vorliegenden Arbeit wurde eine entsprechende Veränderung in das Genom des zp BVDV (CP7), des nzp BVDV (NCP7) und des nzp BVDV-2 (NewYork '93) eingeführt. Das veränderte Mut-CP7-Virus induzierte im Gegensatz zum CP7 keinen ZPE in den infizierten Zellen, so dass damit gezeigt ist, dass die Y→C Mutation im NS4B den Phänotyp verschiedener zp Viren in gleicher Weise ändert.

Viren der klassischen Schweinepest setzen das NS3 konstitutiv frei. Trotz der Menge an gebildetem NS3, die teilweise weit über das Level von Mut-NS4B-CP7 hinausgeht, finden sich in der Regel nur nzp CSFV-Stämme. Zur Abklärung, ob auch bei nzp Viren ein Einfluss durch eine Veränderung im NS4B zu beobachten ist, wurden entsprechende Mutationen auch in nzp BVD- und nzp CSF-Viren eingebracht. Signifikante Wachstumsunterschiede konnten ebenso wenig beobachtet werden wie phänotypische Abweichungen. Unterschiede ergaben sich allerdings in der Menge an gebildeter RNA, wiewohl hier kein einheitliches Verhalten zu beobachten war. Die Rolle des NS4B bei der Entstehung des ZPE bleibt weiterhin offen. Die untersuchte Mutation befindet sich im N-Terminus des NS4B, einer Region, die vermutlich

auf der zytoplasmatischen Seite intrazellulärer Membranen lokalisiert ist und dort möglicherweise mit anderen viralen oder zellulären Proteinen interagiert

## 6. Literaturverzeichnis

- Arias, C. F., F. Preugschat, and J. H. Strauss. "Dengue 2 virus NS2B and NS3 form a stable complex that can cleave NS3 within the helicase domain." Virology 193.2 (1993): 888-99.
- Baker, J. C. "Bovine viral diarrhea virus: a review." J.Am.Vet.Med.Assoc. 190.11 (1987): 1449-58.
- Bartenschlager, R. et al. "Nonstructural protein 3 of the hepatitis C virus encodes a serine-type proteinase required for cleavage at the NS3/4 and NS4/5 junctions." J.Virol. 67.7 (1993): 3835-44.
- Becher, P. et al. "Molecular characterization of border disease virus, a pestivirus from sheep." Virology 198.2 (1994): 542-51.
- Becher, P. et al. "Cytopathogenicity of border disease virus is correlated with integration of cellular sequences into the viral genome." J.Virol. 70.5 (1996): 2992-98.
- Birnboim, H. C. and J. Doly. "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res. 7.6 (1979): 1513-23.
- Bolin, S. R. et al. "Severe clinical disease induced in cattle persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus by superinfection with cytopathic bovine viral diarrhea virus." Am.J.Vet.Res. 46.3 (1985): 573-76.
- Bolivar, F. and K. Backman. "Plasmids of Escherichia coli as cloning vectors." Methods Enzymol. 68 (1979): 245-67.
- Brock, K. V., R. Deng, and S. M. Riblet. "Nucleotide sequencing of 5' and 3' termini of bovine viral diarrhea virus by RNA ligation and PCR." J.Virol.Methods 38.1 (1992): 39-46.
- Brownlie, J., M. C. Clarke, and C. J. Howard. "Experimental production of fatal mucosal disease in cattle." Vet.Rec. 114.22 (1984): 535-36.
- Burnette, W. N. ""Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A." Anal.Biochem. 112.2 (1981): 195-203.
- Carmichael, G. G. and G. K. McMaster. "The analysis of nucleic acids in gels using glyoxal and acridine orange." Methods Enzymol. 65.1 (1980): 380-91.
- Chambers, T. J. et al. "Mutagenesis of the yellow fever virus NS2B protein: effects on proteolytic processing, NS2B-NS3 complex formation, and viral replication." J.Virol. 67.11 (1993): 6797-807.

- Chirgwin, J. M. et al. "Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease." Biochemistry 18.24 (1979): 5294-99.
- Collett, M. S. et al. "Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus." Virology 165.1 (1988a): 191-99.
- Collett, M. S. et al. "Proteins encoded by bovine viral diarrhoea virus: the genomic organization of a pestivirus." Virology 165.1 (1988b): 200-08.
- Collett, M. S., D. K. Anderson, and E. Retzel. "Comparisons of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus with members of the flaviviridae." J.Gen.Virol. 69 ( Pt 10) (1988c): 2637-43.
- Corapi, W. V., R. O. Donis, and E. J. Dubovi. "Monoclonal antibody analyses of cytopathic and noncytopathic viruses from fatal bovine viral diarrhoea virus infections." J.Virol. 62.8 (1988): 2823-27.
- De Moerlooze, L. et al. "The coding region for the 54-kDa protein of several pestiviruses lacks host insertions but reveals a "zinc finger-like" domain." Virology 177.2 (1990): 812-15.
- Deng, R. and K. V. Brock. "Molecular cloning and nucleotide sequence of a pestivirus genome, noncytopathic bovine viral diarrhoea virus strain SD-1." Virology 191.2 (1992): 867-69.
- Deng, R. and K. V. Brock. "5' and 3' untranslated regions of pestivirus genome: primary and secondary structure analyses." Nucleic Acids Res. 21.8 (1993): 1949-57.
- Depner, K., T. Bauer, and B. Liess. "Thermal and pH stability of pestiviruses." Rev.Sci.Tech. 11.3 (1992): 885-93.
- DeSchweinitz, E. A. and M. Dorset. "New facts concerning the etiology of hog cholera." USDA 20th Ann.Rep.Baj (1904): 157-62.
- Donis, R. O. and E. J. Dubovi. "Molecular specificity of the antibody responses of cattle naturally and experimentally infected with cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus biotypes." Am.J.Vet.Res. 48.11 (1987): 1549-54.
- Donis, R. O., W. Corapi, and E. J. Dubovi. "Neutralizing monoclonal antibodies to bovine viral diarrhoea virus bind to the 56K to 58K glycoprotein." J.Gen.Virol. 69 ( Pt 1) (1988): 77-86.
- Doucet, J. P. and J. M. Trifaro. "A discontinuous and highly porous sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide slab gel system of high resolution." Anal.Biochem. 168.2 (1988): 265-71.
- Dunne, H. W., J. F. Hokanson, and A. J. Luedke. "The pathogenesis of hog cholera. I. Route of entrance of the virus into the animal body. " Am.J.Vet.Res. 20 (1959): 615-18.

- Elbers, K. et al. "Processing in the pestivirus E2-NS2 region: identification of proteins p7 and E2p7." J.Virol. 70.6 (1996): 4131-35.
- Failla, C., L. Tomei, and R. De Francesco. "An amino-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protease is essential for interaction with NS4A." J.Virol. 69.3 (1995): 1769-77.
- Frey, H. R. et al. "Experimental transplacental transmission of hog cholera virus in pigs. I. Virological and serological studies." Zentralbl.Veterinärmed.B 27.2 (1980): 154-64.
- Gillespie, J. H. et al. "Comparison by neutralization tests of strains of virus isolated from virus diarrhea and mucosal disease." Cornell Vet 51 (1961): 155-59.
- Grakoui, A. et al. "A second hepatitis C virus-encoded proteinase." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 90.22 (1993a): 10583-87.
- Grakoui, A. et al. "Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites." J.Virol. 67.5 (1993b): 2832-43.
- Grakoui, A. et al. "Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products." J.Virol. 67.3 (1993c): 1385-95.
- Grassmann, C. W. et al. "Genetic analysis of the pestivirus nonstructural coding region: defects in the NS5A unit can be complemented in trans." J.Virol. 75.17 (2001): 7791-802.
- Grummer, B. et al. "Induction of the intrinsic apoptotic pathway in cells infected with cytopathic bovine virus diarrhoea virus." Virus Res. 90.1-2 (2002): 143-53.
- Heinz, F. X. et al. "Family Flaviviridae." Ed. M.H.Van Regenmortel, C.M.Fauquet, and D.H.L.Bishop et al. Academic Press ed. San Diego, Calif.: Academic Press, 2000. 859-79.
- Hewicker, M. et al. "Immunohistological detection of bovine viral diarrhoea virus antigen in the central nervous system of persistently infected cattle using monoclonal antibodies." Vet.Microbiol. 23.1-4 (1990): 203-10.
- Hewicker-Trautwein, M. et al. "[Immunohistochemical studies on organ tropism of different biotypes of BVD virus in experimentally infected sheep fetuses]." Dtsch.Tierärztl.Wochenschr. 104.10 (1997): 436-39.
- Hijikata, M. et al. "Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus." J.Virol. 67.8 (1993): 4665-75.
- Horzinek, M., E. Reczko, and K. Petzoldt. "On the morphology of hog cholera virus." Arch.Gesamte Virusforsch. 21.3 (1967): 475-78.

- Howard, C. J., J. Brownlie, and M. C. Clarke. "Comparison by the neutralisation assay of pairs of non-cytopathogenic and cytopathogenic strains of bovine virus diarrhoea virus isolated from cases of mucosal disease." Vet.Microbiol. 13.4 (1987): 361-69.
- Hugle, T. et al. "The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein." Virology 284.1 (2001): 70-81.
- Hulst, M. M. et al. "Glycoprotein E2 of classical swine fever virus: expression in insect cells and identification as a ribonuclease." Virology 200.2 (1994): 558-65.
- Johnson, C. M. et al. "The NS5A protein of bovine viral diarrhoea virus interacts with the alpha subunit of translation elongation factor-1." J.Gen.Virol. 82.Pt 12 (2001): 2935-43.
- Kamer, G. and P. Argos. "Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses." Nucleic Acids Res. 12.18 (1984): 7269-82.
- Keil, G. M., A. Ebeling-Keil, and U. H. Koszinowski. "Temporal regulation of murine cytomegalovirus transcription and mapping of viral RNA synthesized at immediate early times after infection." J.Virol. 50.3 (1984): 784-95.
- Kessler, S. W. "Use of protein A-bearing staphylococci for the immunoprecipitation and isolation of antigens from cells." Methods Enzymol. 73.Pt B (1981): 442-59.
- Kosmidou, A., M. Büttner, and G. Meyers. "Isolation and characterization of cytopathogenic classical swine fever virus (CSFV)." Arch.Virol. 143.7 (1998): 1295-309.
- Kümmerer, B. Virus Der Bovinen Viralen Diarrhöe - Molekulare Grundlage Der Zytopathogenität Des Stammes Oregon. 1997.
- Kümmerer, B. M., D. Stoll, and G. Meyers. "Bovine viral diarrhea virus strain Oregon: a novel mechanism for processing of NS2-3 based on point mutations." J.Virol. 72.5 (1998): 4127-38.
- Kümmerer, B. M. and G. Meyers. "Correlation between point mutations in NS2 and the viability and cytopathogenicity of Bovine viral diarrhea virus strain Oregon analyzed with an infectious cDNA clone." J.Virol. 74.1 (2000): 390-400.
- Kupfermann, H. et al. "Bovine viral diarrhea virus: characterization of a cytopathogenic defective interfering particle with two internal deletions." J.Virol. 70.11 (1996): 8175-81.
- Lackner, T. et al. "Temporal modulation of an autoprotease is crucial for replication and pathogenicity of an RNA virus." J.Virol. 78.19 (2004): 10765-75.

- Liebler, E. M. et al. "Distribution of antigen of noncytopathogenic and cytopathogenic bovine virus diarrhoea virus biotypes in the intestinal tract of calves following experimental production of mucosal disease." Arch.Virol.Suppl 3 (1991): 109-24.
- Liebler-Tenorio, E. M., J. E. Ridpath, and J. D. Neill. "Distribution of viral antigen and tissue lesions in persistent and acute infection with the homologous strain of noncytopathic bovine viral diarrhoea virus." J.Vet Diagn.Invest 16.5 (2004): 388-96.
- Liess, B. et al. "[Bovine mucosal disease, an immunobiological explainable late stage of BVD-MD virus infection with criteria of a "slow virus infection"]." Dtsch.Tierärztl.Wochenschr. 81.20 (1974): 481-87.
- Liess, B. "Hog Cholera." Ed. E. P. J. Gibbs. Vol. 2. London: Academic Press, 1981. 627-50.
- Liess, B. et al. "Studies on transplacental transmissibility of a bovine virus diarrhoea (BVD) vaccine virus in cattle. II. Inoculation of pregnant cows without detectable neutralizing antibodies to BVD virus 90-229 days before parturition (51st to 190th day of gestation)." Zentralbl.Veterinärmed.B 31.9 (1984): 669-81.
- Lindenbach, B. D. and C. M. Rice. "Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function." J.Virol. 73.6 (1999): 4611-21.
- McClurkin, A. W., S. R. Bolin, and M. F. Coria. "Isolation of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus from the spleen of cattle acutely and chronically affected with bovine viral diarrhoea." J.Am.Vet.Med.Assoc. 186.6 (1985): 568-69.
- McKercher, D. G. et al. "Complications in cattle following vaccination with a combined bovine viral diarrhoea-infectious bovine rhinotracheitis vaccine." J.Am.Vet Med.Assoc. 152.11 (1968): 1621-24.
- Meyer, H. et al. "Experimental transplacental transmission of hog cholera virus in pigs. IV. Virological and serological studies in newborn piglets." Zentralbl.Veterinärmed.B 28.8 (1981): 659-68.
- Meyers, G., T. Rumenapf, and H. J. Thiel. "Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus." Virology 171.2 (1989a): 555-67.
- Meyers, G., T. Rumenapf, and H. J. Thiel. "Ubiquitin in a togavirus." Nature 341.6242 (1989b): 491.
- Meyers, G. et al. "Viral cytopathogenicity correlated with integration of ubiquitin-coding sequences." Virology 180.2 (1991a): 602-16.
- Meyers, G. et al. "Insertion of cellular sequences in the genome of bovine viral diarrhoea virus." Arch.Virol.Suppl 3 (1991b): 133-42.

- Meyers, G. et al. "Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic pestiviruses." Virology 191.1 (1992): 368-86.
- Meyers, G. et al. "Molecular Biology of Pestiviruses and Comparison With HCV." Ed. K. Nishioka et al. Tokyo: Springer-Verlag, 1994. 106-10.
- Meyers, G. and H. J. Thiel. "Cytopathogenicity of classical swine fever virus caused by defective interfering particles." J.Virol. 69.6 (1995): 3683-89.
- Meyers, G. and H. J. Thiel. "Molecular characterization of pestiviruses." Adv.Virus Res. 47 (1996): 53-118.
- Mittelholzer, C. et al. "Generation of cytopathogenic subgenomic RNA of classical swine fever virus in persistently infected porcine cell lines." Virus Res. 51.2 (1997): 125-37.
- Moennig V. "Characteristics of the Virus." Ed. Liess B. Boston: Martinus Nijhoff, 1988. 55-80.
- Moennig, V. et al. "Reproduction of mucosal disease with cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus selected in vitro." Vet Rec. 127.8 (1990): 200-03.
- Moennig, V. and P. G. Plagemann. "The pestiviruses." Adv.Virus Res. 41 (1992): 53-98.
- Moormann, R. J. et al. "Molecular cloning and nucleotide sequence of hog cholera virus strain Brescia and mapping of the genomic region encoding envelope protein E1." Virology 177.1 (1990): 184-98.
- Olafson, P., A. D. MacCallum, and F. H. Fox. "An apparently new transmissible disease of cattle." Cornell Vet. 36 (1946): 205-13.
- Pellerin, C. et al. "Comparison of the p125 coding region of bovine viral diarrhea viruses." Vet.Microbiol. 45.1 (1995): 45-57.
- Peterhans, E., T. W. Jungi, and M. Schweizer. "BVDV and innate immunity." Biologicals 31.2 (2003): 107-12.
- Poch, O. et al. "Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements." EMBO J. 8.12 (1989): 3867-74.
- Pocock, D. H. et al. "Variation in the intracellular polypeptide profiles from different isolates of bovine virus diarrhoea virus." Arch.Virol. 94.1-2 (1987): 43-53.
- Poole, T. L. et al. "Pestivirus translation initiation occurs by internal ribosome entry." Virology 206.1 (1995): 750-54.
- Qi, F. et al. "Analysis of the bovine viral diarrhea virus genome for possible cellular insertions." Virology 189.1 (1992): 285-92.

- Qu, L., L. K. McMullan, and C. M. Rice. "Isolation and characterization of noncytopathic pestivirus mutants reveals a role for nonstructural protein NS4B in viral cytopathogenicity." J.Virol. 75.22 (2001): 10651-62.
- Ramsey, F. K. and W. H. Chivers. "Mucosal disease of cattle." North Amer.Vet. 34 (1953): 629-33.
- Renard, A. et al. "Molecular cloning of the bovine viral diarrhea virus genomic RNA." Ann.Rech.Vet. 18.2 (1987): 121-25.
- Ressang, A. A. "Studies on the pathogenesis of hog cholera. II. Virus distribution in tissue and morphology of the immune response." Zentralbl.Veterinärmed.B 20.4 (1973): 272-88.
- Rice, C. M. "Flaviviridae: the Viruses and Their Replication." Ed. D. M. Howley P. M Knipe. 3. ed. Lippincott-Raven, Philadelphia.: Fields, 1996. 931-59.
- Rigby, P. W. et al. "Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I." J.Mol.Biol. 113.1 (1977): 237-51.
- Rijnbrand, R. et al. "Internal entry of ribosomes is directed by the 5' noncoding region of classical swine fever virus and is dependent on the presence of an RNA pseudoknot upstream of the initiation codon." J.Virol. 71.1 (1997): 451-57.
- Rinck, G. et al. "A cellular J-domain protein modulates polyprotein processing and cytopathogenicity of a pestivirus." J.Virol. 75.19 (2001): 9470-82.
- Rümenapf, T. et al. "Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses." J.Virol. 67.6 (1993): 3288-94.
- Rümenapf, T. et al. "N-terminal protease of pestiviruses: identification of putative catalytic residues by site-directed mutagenesis." J.Virol. 72.3 (1998): 2544-47.
- Saiki, R. K. et al. "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." Science 230.4732 (1985): 1350-54.
- Saiki, R. K. et al. "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science 239.4839 (1988): 487-91.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T Maniatis. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2 ed. Cold Spring Harbor, New York.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 74.12 (1977): 5463-67.
- Santolini, E. et al. "The NS2 protein of hepatitis C virus is a transmembrane polypeptide." J.Virol. 69.12 (1995): 7461-71.

- Schägger, H. and G. von Jagow. "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa." Anal.Biochem. 166.2 (1987): 368-79.
- Schneider, R. et al. "Identification of a structural glycoprotein of an RNA virus as a ribonuclease." Science 261.5125 (1993): 1169-71.
- Schweizer, M. and E. Peterhans. "Oxidative stress in cells infected with bovine viral diarrhoea virus: a crucial step in the induction of apoptosis." J.Gen.Virol. 80 ( Pt 5) (1999): 1147-55.
- Schweizer, M. and E. Peterhans. "Noncytopathic bovine viral diarrhea virus inhibits double-stranded RNA-induced apoptosis and interferon synthesis." J.Virol. 75.10 (2001): 4692-98.
- Smith, L. M. et al. "Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis." Nature 321.6071 (1986): 674-79.
- Stark, R. et al. "Processing of pestivirus polyprotein: cleavage site between autoprotease and nucleocapsid protein of classical swine fever virus." J.Virol. 67.12 (1993): 7088-95.
- Steck, F. et al. "Immune responsiveness in cattle fatally affected by bovine virus diarrhoea-mucosal disease." Zentralbl.Veterinärmed.B 27.6 (1980): 429-45.
- Tautz, N., G. Meyers, and H. J. Thiel. "Processing of poly-ubiquitin in the polyprotein of an RNA virus." Virology 197.1 (1993): 74-85.
- Tautz, N. et al. "Pathogenesis of mucosal disease: a cytopathogenic pestivirus generated by an internal deletion." J.Virol. 68.5 (1994): 3289-97.
- Tautz, N. et al. "Cytopathogenicity of a pestivirus correlates with a 27-nucleotide insertion." J.Virol. 70.11 (1996): 7851-58.
- Tautz, N. et al. "Serine protease of pestiviruses: determination of cleavage sites." J.Virol. 71.7 (1997): 5415-22.
- Tautz, N., A. Kaiser, and H. J. Thiel. "NS3 serine protease of bovine viral diarrhoea virus: characterization of active site residues, NS4A cofactor domain, and protease-cofactor interactions." Virology 273.2 (2000): 351-63.
- Tautz, N. and H. J. Thiel. "Cytopathogenicity of pestiviruses: cleavage of bovine viral diarrhoea virus NS2-3 has to occur at a defined position to allow viral replication." Arch.Virol. 148.7 (2003): 1405-12.
- Thiel, H. J. et al. "Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus." J.Virol. 65.9 (1991): 4705-12.
- Thiel, H.-J., P. G. W. Plagemann, and V. Moennig. "Pestiviruses." Ed. B. N. Fields, D. M. Knipe, and Howley P.M. 3 ed. Lippincott-Raven, Philadelphia: 1996. 1059-73.

- Tomei, L. et al. "NS3 is a serine protease required for processing of hepatitis C virus polyprotein." J.Virol. 67.7 (1993): 4017-26.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 76.9 (1979): 4350-54.
- van Oirschot, J. T. and C. Terpstra. "A congenital persistent swine fever infection, I. Clinical and virological observations." Veterinary microbiology: an international journal 2 (1977): 121-32.
- van Oirschot, J. T. "Description of the Virus Infection." Ed. B. Liess. Boston U.S.A: Martinus Nijhoff Publishing, 1988. 1-25.
- van Zijl, M. et al. "Live attenuated pseudorabies virus expressing envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus protects swine against both pseudorabies and hog cholera." J.Virol. 65.5 (1991): 2761-65.
- Vassilev, V. B. and R. O. Donis. "Bovine viral diarrhea virus induced apoptosis correlates with increased intracellular viral RNA accumulation." Virus Res. 69.2 (2000): 95-107.
- Vogelstein, B. and D. Gillespie. "Preparative and analytical purification of DNA from agarose." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 76.2 (1979): 615-19.
- Warrener, P., J. K. Tamura, and M. S. Collett. "RNA-stimulated NTPase activity associated with yellow fever virus NS3 protein expressed in bacteria." J.Virol. 67.2 (1993): 989-96.
- Warrener, P. and M. S. Collett. "Pestivirus NS3 (p80) protein possesses RNA helicase activity." J.Virol. 69.3 (1995): 1720-26.
- Weiland, E. et al. "Development of monoclonal neutralizing antibodies against bovine viral diarrhea virus after pretreatment of mice with normal bovine cells and cyclophosphamide." J.Virol.Methods 24.1-2 (1989): 237-43.
- Wengler, G. et al. "In vitro synthesis of West Nile virus proteins indicates that the amino-terminal segment of the NS3 protein contains the active centre of the protease which cleaves the viral polyprotein after multiple basic amino acids." J.Gen.Virol. 72 ( Pt 4) (1991): 851-58.
- Wengler G. et al. "Family Flaviviridae." Ed. F. A. Murphy et al. Wien, New York.: Springer-Verlag, 1995. 415-27.
- Wilhelmsen, C. L. et al. "Lesions and localization of viral antigen in tissues of cattle with experimentally induced or naturally acquired mucosal disease, or with naturally acquired chronic bovine viral diarrhea." Am.J.Vet Res. 52.2 (1991): 269-75.
- Windisch, J. M. et al. "RNase of classical swine fever virus: biochemical characterization and inhibition by virus-neutralizing monoclonal antibodies." J.Virol. 70.1 (1996): 352-58.

- Wiskerchen, M. and M. S. Collett. "Pestivirus gene expression: protein p80 of bovine viral diarrhoea virus is a proteinase involved in polyprotein processing." Virology 184.1 (1991): 341-50.
- Wyatt, L. S., B. Moss, and S. Rozenblatt. "Replication-deficient vaccinia virus encoding bacteriophage T7 RNA polymerase for transient gene expression in mammalian cells." Virology 210.1 (1995): 202-05.
- Xiao, M. et al. "Classical swine fever virus NS5B-GFP fusion protein possesses an RNA-dependent RNA polymerase activity." Arch.Virol. 147.9 (2002): 1779-87.
- Xiao, M. et al. "Characterization of RNA-dependent RNA Polymerase Activity of CSFV NS5B Proteins Expressed in Escherichia coli." Virus Genes 27.1 (2003): 67-74.
- Xu, J. et al. "Bovine viral diarrhoea virus NS3 serine proteinase: polyprotein cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of an enzyme essential for pestivirus replication." J.Virol. 71.7 (1997): 5312-22.
- Xue, W., S. Zhang, and H. C. Minocha. "Characterization of a putative receptor protein for bovine viral diarrhoea virus." Vet.Microbiol. 57.2-3 (1997): 105-18.
- Yu, H., C. W. Grassmann, and S. E. Behrens. "Sequence and structural elements at the 3' terminus of bovine viral diarrhoea virus genomic RNA: functional role during RNA replication." J.Virol. 73.5 (1999): 3638-48.
- Zhang, G. et al. "Cell death induced by cytopathic bovine viral diarrhoea virus is mediated by apoptosis." J.Gen.Virol. 77 ( Pt 8) (1996): 1677-81.
- Zhang, G., H. Flick-Smith, and J. W. McCauley. "Differences in membrane association and sub-cellular distribution between NS2-3 and NS3 of bovine viral diarrhoea virus." Virus Res. 97.2 (2003): 89-102.
- Zhong, W., L. L. Gutshall, and A. M. Del Vecchio. "Identification and characterization of an RNA-dependent RNA polymerase activity within the nonstructural protein 5B region of bovine viral diarrhoea virus." J.Virol. 72.11 (1998): 9365-69.

## Verwendete Oligonukleotidprimer

Schreibweise der Primer immer in 5'→3'-Orientierung

Primer zur Erzeugung von Mutanten an der Spaltstelle NS2/3  
des BVDV-Stamms Oregon:

Mut	sense 5' <span style="float: right;">3'</span>
43	gga tcc taa ggc cgc ctg ccg tat gc
44	gga tcc taa ggg acc ctg ccg tat gc
45	gga tcc taa gga gcc ctg ccg tat gc
46	gga tcc taa ggg cgc ctg ccg tat gc
56	aac acc ttg gtg cga tcc taa ggg g
57	acc ttg gtt gga ggc taa ggg ggc c
58	ttg gtt gga tcg aga ggg ggc ctg c
59	gtt gga tcc tag cag ggc ctg ccg t
60	gtt gga tcc tag acg ggc ctg ccg t
61	gtt gga tcc taa tcg ggc ctg ccg t
62	gtt gga tcc tac cgg ggc ctg ccg t

Mut	reverse 5' <span style="float: right;">3'</span>
43	gca tac ggc agg cgg cct tag gat cc
44	gca tac ggc agg gtc cct tag gat cc
45	gca tac ggc agg gct cct tag gat cc
46	gca tac ggc agg cgc cct tag gat cc
56	ccc ctt agg atc gca cca agg tgt t
57	ggc ccc ctt agc ctc caa cca agg t
58	gca ggc ccc ctc tcg atc caa cca a
59	acg gca ggc cct gct agg atc caa c
60	acg gca ggc ccg tct agg atc caa c
61	acg gca ggc ccg att agg atc caa c
62	acg gca ggc ccc ggt agg atc caa c

**Primer zur Erzeugung von Mutanten an der Spaltstelle NS2/3  
des CSFV-Stamms Alfort/Tübingen:**

Mut	sense 5' <span style="float: right;">3'</span>
43	gct ggg tgc tta gac ccc cag ctg ttt gc
44	gct ggg tgc tta gag atc cag ctg ttt gc
45	gct ggg tgc tta gaa gtc cag ctg ttt gc
46	gct ggg tgc tta gag cgc cag ctg ttt gc
56	gga aca cct tgg cgc ggt gct tag agg gc
57	cac ctt ggc tgg cgc ctt aga ggg cca gc
58	cct tgg ctg ggt gga gag agg gcc agc tg
59	cct tgg ctg ggt gct tgc ggg gcc agc tgt ttg
60	cct tgg ctg ggt gct tga cgg gcc agc tgt ttg
61	cct tgg ctg ggt gct tat cgg gcc agc tgt ttg
62	cct tgg ctg ggt gct tcc cgg gcc agc tgt ttg
63	cct tgg ctg ggt gct taa ggg gcc agc tgt ttg
64	cct tgg ctg ggt gct tca cgg gcc agc tgt ttg

Mut	reverse 5' <span style="float: right;">3'</span>
43	gca aac agc tgg ggg tct aag cac cca gc
44	gca aac agc tgg atc tct aag cac cca gc
45	gca aac agc tgg act tct aag cac cca gc
46	gca aac agc tgg cgc tct aag cac cca gc
56	gcc ctc taa gca ccg cgc caa ggt gtt cc
57	gct ggc cct cta agg cgc cag cca agg tg
58	cag ctg gcc ctc tct cca ccc agc caa gg
59	caa aca gct ggc ccc gca agc acc cag cca agg
60	caa aca gct ggc ccg tca agc acc cag cca agg
61	caa aca gct ggc ccg ata agc acc cag cca agg
62	caa aca gct ggc ccg gga agc acc cag cca agg
63	caa aca gct ggc ccc tta agc acc cag cca agg
64	caa aca gct ggc ccg tga agc acc cag cca agg

**Primer zum Setzen einer Punktmutation im NS4B:**

Virus	Orientierung	5'	3'
CSFV:	sense	gaa gca gtg acc aat tgc gcg aga gag ggc atc	
	reverse	gat gcc ctc tct cgc gca att ggt cac tgc ttc	
Oregon:	sense	ggg cta tct cag act gcg cag ctg gag gac tg	
	reverse	cag tcc tcc agc tgc gca gtc tga gat agc cc	
CP7:	sense	gtt cca tct cgg act gcg cat cag agg gat tg	
	reverse	caa tcc ctc tga tgc gca gtc cga gat gga ac	
NewYork:	sense	ggt aga ctg ctc caa ac	
	reverse	gtt tgg agc agt cta cc	

**Primer zur Erstellung des pRB39:**

BVD2.2.seq: cgt cag tgg ttc gac gc

Citelinker.seq:

gcg gat ccg gga att cgc ggc cgc tcg cga aag ctt ggg cga att aat tcc gg

Ns3nco.seq: gcg cca tgg gca atg ccg tgt gc

Ns3sac.rev: ggg agc tca gtg gtc ttc cct gc

Nprobam.rev: gcg gat ccg cag cct gaa acc

**Oligonukleotidprimer zum Austausch der Promotorregion zur Erstellung des pRB50:**

T7pest1.seq: ata aga atg cgg ccg caa tac gac tca cta tag gta tac g

csfv450.rev: gtc tcc ccg cgg tgt cat aca ccg

**Primer zur Erstellung des pRB56:**

pan315.seq: gga att cgg gtg ctg cag agg ccc

pan270.rev: gga att ccc ccg cca ggg tta agg

**Weitere Primer zur Überprüfung und Sequenzierung von Konstrukten:**

PanPestiprimer:

panpesti.seq: atg ccc ata gta gga cta gca

panpesti.rev: caa ctc cat gtg cca atg tac

CSFV:

csfv4881.seq: gga cca cca gtg gtc tgc ggt atg ac

hcv57-1.seq: ggt cta tca aca gca gag aag

csfv5700.rev: gga atc ctc gtt ctt ccc

csfv7617.rev: ggc acc aat gct ctt ata caa tgc

BVDV:

B35-2.seq: cat ata cac tat aga aga tca aag

CM38.seq: gga tct agc agt gga tct tc

N-NS4A.seq: gtg gcc ggg ccc tct tca gct gag aat g

BVDV-O.rev: cac agg cca tat ctg att atg g

CM57.rev: cag gtt cga caa ccc gtt

C-NS4A.rev: gct cta gac tac aga ttc ctt att ttt cc

Allgemeine Primer:

pCite.seq: cgg gga cgt ggt ttt cct tt

pCite.rev: cag cta tga cca tga tta cg

GAPDH.seq: ggg cgc ctg gtc acc agg gct

GAPDH.rev: gag ggc aat gcc agc ccc agc

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

---

Name: Roger Bernhard  
Geboren: 08.10.1967 in Koblenz  
Eltern: Helmut Bernhard  
          Hannelore Bernhard  
Familienstand: ledig

## Bildungsweg

---

1974 – 1978 Comenius Grundschule in Koblenz  
1978 – 1984 Clemens-Brentano Realschule in Koblenz  
1984 – 1988 Hilda-Gymnasium in Koblenz  
1992 – 1994 Abendgymnasium in Reutlingen  
Allgemeine Hochschulreife

## Aus- und Fortbildung

---

1989 – 1991 Ausbildung zum med.-techn. Assistenten an  
den Bernd-Blindow-Schulen Koblenz  
  
1994 – 2000 Studium der Biologie an der  
Eberhard Karls Universität in Tübingen  
  
Aug. 1997 Anwendung der konfokalen Mikroskopie in der  
Mikrobiologie am Max-Planck-Institut für  
Biologie in Tübingen  
  
Dez. 1997 Zellkulturkurs: „Humane Gefäßwandzellen in  
Mono- und Co-Kulturen für pharmak.  
Prescreening-Verfahren“ am Uniklinikum  
Tübingen

Nov. 2002 Teilnahme an der Fortbildung für Beauftragte für die Biologische Sicherheit an der Universität Tübingen

### **Beruflicher Werdegang**

---

1991 – 1996	Med.-techn. Assistent an der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere in Tübingen, AGs Dr. Ahl / Dr. Haas und AG Dr. Rziha
1996 – 1998	Med.-techn. Assistent am Universitätsklinikum Tübingen, AG Dr. Brehm
1998	Hilfswissenschaftlicher Assistent an der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde in Tübingen, AG Dr. Pfister
1999 – 2000	Anfertigung der Diplomarbeit an der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere in Tübingen, AG Dr. Saalmüller
seit 2000	Wissenschaftlicher Angestellter an der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere in Tübingen, AG PD Dr. Meyers



Im Selbstverlag herausgegeben von:

Roger Bernhard

Heine Straße 68/3

72762 Reutlingen