

**Untersuchungen zur RNA-Rekombination beim
Virus der bovinen viralen Diarrhö -
Einfluss einer zellulären Insertion auf die virale
Polyproteinprozessierung und Zytopathogenität**

D I S S E R T A T I O N

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2003

vorgelegt von

Jens G. Fricke

Tag der mündlichen Prüfung:

4. September 2003

Dekan:

Prof. Dr. H. Probst

1. Berichterstatter:

PD Dr. G. Meyers

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. H. Probst

1	EINLEITUNG.....	1
2	MATERIAL UND METHODEN.....	8
2.1	Material.....	8
2.1.1	Chemikalien	8
2.1.2	Geräte	8
2.1.3	Verbrauchsmaterial	8
2.1.4	Vorgefertigte Systeme („Kits“).....	8
2.1.5	Synthetische Oligonukleotide (Gibco).....	9
2.1.6	Angewandte Plasmide	11
2.1.7	Bakterienstämme und Bakteriophagen.....	11
2.1.8	Enzyme.....	11
2.1.9	Radioaktive Substanzen	11
2.1.10	Serologische Reagenzien.....	11
2.1.11	Virusstämme.....	12
2.1.12	Zellkulturmedien	12
2.1.13	Zellen.....	12
2.2	Methoden.....	13
2.2.1	Gewebekultur	13
2.2.2	Passagierung von Virusüberständen	13
2.2.3	Immunhistochemie	13
2.2.3.1	Chemische Fixierung	13
2.2.3.2	Indirekte Immunfluoreszenz	13
2.2.4	Transiente Expression im „Vaccinia Virus-T7-System“	13
2.2.5	Expression mit Hilfe des pSinRep5-Systems.....	14
2.2.5.1	pSin-RNA-Transfektion von BHK-Zellen.....	14
2.2.5.2	Herstellung von Gesamtproteinextrakten aus Sindbis infizierten Zellen.....	14
2.2.6	Arbeiten mit Nukleinsäuren	14
2.2.6.1	Plasmid-Maxi-DNA-Isolierung	14
2.2.6.2	Plasmid-Mini-DNA-Isolierung	15
2.2.6.3	Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäurelösungen.....	15
2.2.6.4	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	15
2.2.6.5	Herstellung von glatten DNA-Enden.....	15
2.2.6.6	Agarose-Gelelektrophorese (DNA)	16
2.2.6.7	Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	16

2.2.6.8	Ligation	16
2.2.6.9	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	16
2.2.6.10	Reverse Transkription (RT-PCR)	17
2.2.6.11	Isolierung von Gesamtzell-RNA	17
2.2.6.12	Isolierung von Gesamt-RNA aus Jasper-Rinderserum	17
2.2.6.13	Auftrennung von RNA durch Agarosegelelektrophorese	17
2.2.6.14	Transfer von RNA („Northern Transfer“)..	18
2.2.6.15	Herstellung von radioaktiven DNA-Sonden durch „Nick“-Translation	18
2.2.6.16	Aufreinigung radioaktiv markierter DNA-Sonden	18
2.2.6.17	Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden	18
2.2.7	DNA-Sequenzanalysen	19
2.2.7.1	Sequenzierung von PCR-Fragmenten und Plasmid-DNA	19
2.2.7.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur DNA-Sequenzanalyse	19
2.2.8	Mikrobiologische Methoden	20
2.2.8.1	Bakterienanzucht	20
2.2.8.2	Herstellung kompetenter <i>E. Coli</i>	20
2.2.8.3	Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA	20
2.2.9	Hefebiologische Methoden	21
2.2.9.1	Herstellung kompetenter Hefen und Transformation mit Plasmid-DNA	21
2.2.9.2	Herstellung von Hefen für Gesamtproteinextraktion	21
2.2.9.3	Präparation von Gesamtproteinextrakten aus Hefen	22
2.2.10	<i>In vitro</i> -Transkription	22
2.2.11	<i>In vitro</i> -Translation	22
2.2.12	Durchsicht einer bovinen λ -cDNA-Bibliothek	23
2.2.12.1	Plattieren der cDNA-Phagenbank	23
2.2.12.2	Anfertigung von Replikas auf Nylonmembranen	23
2.2.12.3	Isolierung positiver Plaques	23
2.2.12.4	<i>In vivo</i> -Exzision	23
2.2.13	Proteinchemische Arbeitsmethoden	24
2.2.13.1	Radioimmunpräzipitation	24
2.2.13.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	25
2.2.13.3	Gelbehandlung und Fluorografie	25
2.2.13.4	Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran („Western Blot“)	25
2.2.14	Analyseprogramme	26
2.2.15	Expressionsplasmide	26
2.2.15.1	Herstellung der Konstrukte pSK-LC3 und pSK-LC3	26
2.2.15.2	Herstellung der Konstrukte pLexAII, pLex-B/LC3 und pLex-B/LC3 Δ	26

2.2.15.3	Herstellung der Konstrukte pSin-LC3 und pSin-LC3 Δ	26
2.2.15.4	Herstellung der Konstrukte pEX- AS ¹ _Px ²	27
2.2.15.5	Herstellung der Konstrukte pEX-a/c Δ x	27
2.2.15.6	Das bAut2B1-Konstrukt	27
2.2.15.7	Das bAut2B2-Konstrukt	28
2.2.15.8	Das cAut2B-Konstrukt	28
2.2.15.9	Das bAut2A-Konstrukt	28
2.2.15.10	Herstellung des pSK-cLC3-Konstrukts	29
3	ERGEBNISSE	30
3.1	Untersuchungen zu viralen RNA-Rekombinationen	30
3.1.1	Genomanalyse autonom replikationsfähiger zytopathogener Viren	30
3.1.2	Sequenzanalyse der Rekombinationsstellen	36
3.1.3	Chronologische Erfassung von Rekombinanten aus Jasper	38
3.2	Untersuchungen zur LC3 induzierten Proteinspaltung	39
3.2.1	Einfluss von Proteaseinhibitoren auf die Polyproteinprozessierung	39
3.2.2	Die Klonierung von potentiellen Proteasegenen	40
3.2.3	Analyse der Proteasekandidaten oder die Suche nach einem Testsystem	43
3.2.4	Expression von LC3 in Hefe	45
3.2.5	Komplementation einer Aut2 Mutation des Autophagozytosesystems in Hefe	47
3.2.6	Koexpression von Proteasekandidaten und LC3 in Hefe	48
3.2.7	Analyse der LC3 spezifischen Proteasen in der in vitro-Translation	51
3.2.8	Verlust der Spaltung durch Verkürzung der LC3 Insertion	55
3.2.9	Veränderung der Polyproteinprozessierung durch Punktmutationen	57
4	DISKUSSION	60
5	ZUSAMMENFASSUNG	75
6	LITERATURVERZEICHNIS	77
7	VERÖFFENTLICHUNGEN	86
8	DANKSAGUNG	87

Abkürzungen

A	Adenin	dNTP	Desoxyribonukleosidtri- phosphat
AA	<i>Aedes Albopictus</i>	dTTP	Desoxythymidintriphosphat
Abb.	Abbildung	<i>E.Coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
Ac	Acetat	EDTA	Ethylendiamintetraessig- säure
Amp	Ampicillin	EtBr	Ethidiumbromid
Apg	„Autophagy“	EtOH	Ethanol
APS	Ammoniumperoxodisulfat	FCS	fötales Käberserum
ATP	Adenosintri-phosphat	FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Aut	„Autophagocytosis“	g	Gramm
BFAV	Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere	G	Guanin
bp	Basenpaar	GTP	Guanosintri-phosphat
BVDV	“Bovine Viral Diarrhea Virus”	h	Stunde
C	Cytosin	HCV	Hepatitis C Virus
°C	Grad Celsius	IgG	Immunglobulin G
cDNA	komplementäre DNA	IRES	“Internal Ribosome Entry Site”
Ci	Curie	kb	Kilobasen
CIP	“Calf Intestinal Phosphatase”	kD	Kilodalton
Cpm	“counts per minute”	l	Liter
c-terminal	carboxyterminal	LB	Luria-Bertrani
C-Terminus	Carboxyterminus	LiAc	Lithiumacetat
CTP	Cytidintri-phosphat	m	Milli
dATP	Desoxyadenosintri-phosphat	μ	Mikro
dCTP	Desoxycytidintri-phosphat	M	Molar
dGTP	Desoxyguanosintri-phos- phat	MD	“Mucosal Disease”
DI	defektes interferierendes Partikel	min	Minute
DMSO	Dimethylsulfoxid	m.o.i.	“multiplicity of infection”
DNA	Desoxyribonukleinsäure	N-terminal	aminoterminal
		N-Terminus	Aminotermius
		nzp	nicht zytopathogen
		OD	Optische Dichte
		p	piko

PAA	Polyacrylamid		methan
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese	U	“Units”
PBS	“Phosphate Buffered Saline”	UTP	Uridintriphosphat
PCR	Polymerasekettenreaktion	Upm	Umdrehungen pro Minute
PE	Phosphatidylethanolamin	UTR	„Un-Translated Region“
PEG	Polyethylenglykol	V	Volt
pfu	“plaque forming unit”	v/v	Volumenprozent
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid	w/v	Gewichtsprozent
RIP	Radioimmunpräzipitation	wt	Wildtyp
RNA	Ribonukleinsäure	zp	zytopathogen
RNase	Ribonuklease		
RT	Raumtemperatur		
RT-PC	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion		
SDS	Natriumdodecylsulfat		
s	Sekunde		
SSC	„Standard Saline Citrate“		
T	Thymin		
Tab.	Tabelle		
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer		
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer		
TE	Tris-EDTA-Puffer		
TES	Tris-EDTA-SDS-Puffer		
TLCK	“N- α -Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone”		
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin		
Tricin	N-Tris(hydroxymethyl)methylglycin		
Tris	Trihydroxymethylamino-		
		Aminosäuren	
		A	Alanin
		C	Cystein
		D	Aspartat
		K	Glutamat
		F	Phenylalanin
		G	Glycin
		H	Histidin
		I	Isoleucin
		K	Lysin
		L	Leucin
		M	Methionin
		N	Asparagin
		P	Prolin
		Q	Glutamin
		R	Arginin
		S	Serin
		T	Threonin
		V	Valin
		W	Tryptophan
		Y	Tyrosin

1 Einleitung

Das Virus der bovinen viralen Diarrhö („bovine viral diarrhea virus“, BVDV) gehört zum Genus *Pestivirus*. Zusammen mit den Vertretern der Genera *Hepacivirus* und *Flavivirus* bilden Pestiviren die Familie *Flaviviridae*. Diese Familie umfasst umhüllte Viren mit einem einzelsträngigen RNA-Genom positiver Polarität, die wichtige Pathogene von Mensch und Tier darstellen, wie z.B. das Gelbfiebervirus, das „Dengue virus“, das „West Nile virus“, das Schweinepestvirus („classical swine fever virus“ CSFV) und das Hepatitis C-Virus (HCV) (Lindenbach und Rice, 2001). Die Organisation des viralen Genoms und die Charakteristika der Genexpression sowie der Prozessierung der viralen Proteine sind innerhalb der Familie ähnlich und dienen als Kriterium für die Familienzugehörigkeit. Besondere Ähnlichkeit besteht dabei interessanterweise zwischen HCV und den Pestiviren, so dass Pestiviren vielfach als Modell für die HCV-Forschung dienen (Miller und Purcell, 1990; Lindenbach und Rice, 2001).

Durch Elektronenmikroskopie wurde das BVDV-Virion sichtbar gemacht. Das im Durchmesser 40 - 60 nm große Viruspartikel besteht aus einer Lipidhülle und einem Nucleokapsid, das vermutlich die virale RNA enthält. Das Nucleokapsid besteht nach heutigem Kenntnisstand aus nur einer Proteinspezies, dem Kapsidprotein „C“. In die Membranhülle des Viruspartikels sind drei verschiedene Glykoproteine eingelagert. Das nichtsegmentierte virale Genom ist nicht polyadenyliert und besitzt keine „Cap“-Struktur am 5'-Ende. Es hat eine Größe von ca. 12,5 kb und enthält einen offenen Leserahmen (ORF), der an beiden Enden von nichtkodierenden Regionen (UTR's) flankiert ist (Collett et al., 1988; Meyers et al., 1989; Moormann et al., 1990; Deng et al., 1992).

Nach Penetration der Zelle und Aufschluß der Virushülle („uncoating“) dient das aus dem Partikel freigesetzte Genom zuerst als mRNA. Die Initiation der Translation des viralen Genoms geschieht in einer cap-unabhängigen Art und Weise. Der Vorgang wird durch eine Typ IV „internal ribosome entry site“ (IRES) kontrolliert, die von der 5' UTR und den ersten Nukleotiden der Protein-kodierenden Region gebildet wird. Die IRES besteht aus 4 unterschiedlichen Strukturdomänen: Ia, Ib, II und III. Davon stellt Teil Ia ein bifunktionales RNA-Signal dar, das sowohl für die Translation als auch für die Replikation notwendig ist (Poole et al., 1995; Rijnbrand et al., 1997; Yu et al., 2000).

Die Translation des ORFs führt zur Synthese eines ca. 4000 Aminosäuren langen Polyproteins, das co- und posttranslational in mindestens 11 reife virale Proteine gespalten wird. Die Organisation des Polyproteins von Pestiviren ist: NH₂-N^{pro}-C-E^{ms}-E1-E2-p7-NS2-

3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH. Das N^{pro} ist eine Autoprotease, die sich autokatalytisch vom Polyprotein abspaltet (Wiskerchen et al., 1991; Stark et al. 1993; Rümenapf et al., 1998). Das Signalpeptid zwischen C und E^{ms} bewirkt die Translokation der Strukturglykoproteine E^{ms}, E1, E2 und des Nichtstrukturproteins p7 in das ER Lumen. Ihre Spaltung erfolgt durch zelluläre Proteasen, vermutlich Signalpeptidasen. So erfüllen alle fraglichen Spaltstellen die Kriterien für Signalasespaltung; eine Ausnahme bildet lediglich die Prozessierungsstelle zwischen E^{ms} und E1, so dass bisher fraglich ist, welche Protease diese beiden Proteine trennt. Dagegen konnte die Generierung des aminoterminalen Endes des Nichtstrukturproteins NS2, das im Polyprotein dem p7 folgt, durch Signalasespaltung in Experimenten nahegelegt werden (Rümenapf et al., 1993; Elbers et al., 1996; Harada et al., 2000).

Die Strukturproteine bilden zusammen mit dem Genom die Viruspartikel, die aus dem Kapsidprotein (C) und in die Lipidhülle eingelagerten E^{ms} Homodimeren, E1/E2 Heterodimeren und E2 Homodimeren besteht. E^{ms} und E2 konnten in Virionen ebenfalls als Monomere nachgewiesen werden, jedoch war der Anteil der monomeren Form wesentlich geringer als in der Zelle (Thiel et al., 1991; Weiland et al., 1990). Die Bildung neutralisierender Antikörper wird durch E^{ms} und E2 induziert (Donis et al., 1988; Weiland et al., 1990; Weiland et al., 1992). Das E^{ms} Protein von CSFV und BVDV zeigt Ribonuklease-Aktivität; diese enzymatische Aktivität des E^{ms} Proteins ist für die Virusreplikation in Gewebekulturzellen entbehrlich, scheint aber Auswirkungen auf die Pathogenität der Erreger zu haben (Schneider et al., 1993; Hulst et al., 1994; Windisch et al., 1996; Meyers et al., 1999; Meyer et al., 2002). Das p7 Protein ist notwendig für die Generierung von Virionen, ist aber für die RNA Replikation entbehrlich. Es konnte nicht im Viruspartikeln nachgewiesen werden (Elbers et al., 1996; Harada et al., 2000). Für das dem p7 der Pestiviren sehr ähnliche HCV p7 Protein konnte in *in vivo*- und *in vitro*-Versuchen die Oligomerisierung von Hexamerstrukturen nachgewiesen werden. Diese Strukturen sind an der Ausbildung von Ca²⁺ Kanälen beteiligt, so dass das p7 Protein von HCV und vermutlich auch das p7 von Pestiviren zur Gruppe der sogenannten Viroporine gehört (Griffin et al., 2003).

Die im Polyprotein auf das p7 folgenden Nichtstrukturproteine NS2-3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B werden durch eine im aminoterminalen Bereich von NS3 lokalisierte Serinprotease mit NS4A als Kofaktor gespalten; NS2-3 wird bei vielen BVDV nicht in NS2 und NS3 gespalten (Wiskerchen und Collett, 1991, Tautz et al., 1997; Xu et al., 1997; Kümmerer et al., 2000). Zusätzlich konnten für den Nichtstrukturproteinbereich zwei weitere Enzymfunktionen ermittelt werden; zum einen wurde im carboxyterminalen Bereich von NS3 eine NTPase/RNA-Helikase nachgewiesen, die für die Replikation notwendig ist (Tamura et al.,

1993; Warrener und Collett, 1995; Grassmann et al., 1999); zum andern ist im NS5B Protein die virale RNA-abhängige Polymerase lokalisiert (Behrens et al., 1996; Zhong et al., 1998; Steffens et al., 1999). Die Funktionen von NS4B und NS5A konnten bisher noch nicht vollständig aufgeklärt werden. NS5A stellt ein Phosphoprotein dar, das durch eine Serin-/Threonin-Kinase phosphoryliert wird (Reed et al., 1998). Interessant ist, dass NS5A von HCV mit der Proteinkinase PKR (RNA-abhängige Proteinkinase) interagiert und bei der Interferonresistenz verschiedener HCV-Varianten eine Rolle spielen könnte (Gale et al., 1997).

Nach Translation und Prozessierung des viralen Polyproteins findet die Replikation statt. Diese startet mit der Transkription einer RNA-Kopie negativer Orientierung durch die RNA abhängige Polymerase in 5' nach 3' Richtung mit genomischer RNA als Matrize. Vergleichsstudien verschiedener Pestivirussequenzen zeigten, dass die 3'UTR aus einer konservierten und einer variablen Region besteht. Die konservierte Region besteht aus der Sekundärstruktur-reichen Region (SL-I), einer einzelsträngigen hochkonservierten Sequenz (SS), die die SL-I mit der Sekundärstruktur-reichen Region (SL-II) verbindet, und einem Anteil von SL-II. Die konservierte Region enthält Struktur- und Sequenzelemente, die in cis für die Initiation der Replikation notwendig sind. Die Aufgabe einer dritten Sekundärstruktur 5' von SL-II muss weiter untersucht werden (Deng und Brock, 1993; Yu, et al., 1999). Subgenomische BVDV-RNA, bestehend aus der 5'UTR, dem N^{pro}-Gen, den Sequenzen, die für die Nichtstrukturproteine NS3 bis NS5B kodieren und der 3'UTR, sind fähig zur autonomen Replikation in transfizierten Wirtszellen; sie stellen damit sogenannte Replikons dar. Diese Tatsache zeigt, dass die Nichtstrukturproteine p7 und NS2 nicht notwendig für die RNA-Replikation sind (Behrens et al., 1998). Durch zusätzliche Deletion der N^{pro} kodierenden Sequenz (bis auf die ersten 3 AS) konnten Replikons erzeugt werden, die ohne N^{pro} autonom replizieren und in der Lage sind, Zellen zu lysieren (Tautz et al., 1999). Änderungen des molaren Verhältnisses der Prozessierungsprodukte NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B bei Replikons korrelieren mit replikationsunfähigen Phänotypen. Die proteolytische Reifung der viralen Polyproteine ist somit ein fein ausbalancierter Prozess, der wahrscheinlich mit der RNA Replikation eng verbunden ist. Durch Komplementationsversuche konnte gezeigt werden, dass NS3, NS4A, NS4B und NS5B als cis-aktive-Elemente beim Aufbau des Replikationskomplexes fungieren, wohingegen NS5A ein trans-aktives Element ist (Grassmann et al., 1999; Grassmann et al., 2001).

BVD wurde aufgrund seiner niedrigen Mortalitätsrate erst im Jahr 1946 als eine auf Rinder übertragbare Krankheit beschrieben (Olafsen et al., 1946). Die Erkrankung geht mit

Symptomen wie erhöhter Temperatur, respiratorischen Störungen und Diarrhö einher und wurde entsprechend des auffälligsten Symptoms als bovine virale Diarrhö bezeichnet. Einige Jahre später wurde ein Krankheitsbild bei Rindern beschrieben, das Pyrexie, Anorexie, Lethargie, eine profuse Diarrhö mit frischem und verklebtem Blut, nasalen Ausfluss eitrigem Schleims und Dehydrierung umfasst; aufgrund ihrer Auswirkungen auf die Schleimhäute im Mund, Nasen und Rachenraum wurde die Krankheit Schleimhautrekrankung der Rinder („mucosal disease“ MD) genannt (Ramsey und Chivers, 1953). Später konnte gezeigt werden, dass beide Erkrankungen durch das gleiche Virus verursacht werden (Gillespie et al., 1961). MD ist eine in Rindern zwischen dem 6. Lebensmonat und dem 2. Lebensjahr sporadisch auftretende, immer tödlich verlaufende Krankheit. Der Tod erfolgt nach Auftreten klinischer Symptome innerhalb von ca. zwei Wochen; postmortem durchgeführte Untersuchungen zeigten Geschwülbildungen im Gastrointestinaltrakt (Baker, 1987).

Ein Durchbruch zur Aufklärung der Entstehung von MD war die Entdeckung, dass an MD zugrunde gegangene Rinder konsistent sogenannte Viruspaare von serologisch und genetisch eng verwandten zytopathogenen (zp) und nicht zytopathogenen (nzp) BVD-Viren enthalten (Thiel et al., 1996). Voraussetzung für die Entwicklung von MD ist nach heutigem Kenntnisstand die Infektion einer trächtigen Kuh mit einem nzp BVD-Virus im ersten Drittel der Trächtigkeit (Liess et al., 1984). Hierdurch kommt es beim Fötus zur Ausbildung einer Immuntoleranz, die eine persistente Infektion ermöglicht. Die Toleranz zeigt sich darin, dass weder spezifische Antikörper noch zytotoxische T-Zellen gegen das persistente Virus existieren; sie beschränkt sich auf den Virusstamm, der die intrauterine Infektion bewirkte (Thiel et al., 1996). Aus dieser persistenten Infektion entwickelt sich MD entweder durch Superinfektion mit einem serologisch ähnlichen zp BVD-Virus oder durch Entstehung eines zp BVD-Virus aus dem persistierenden BVD-Virus durch Mutation.

Die vorliegenden Daten lassen sich so interpretieren, dass zp BVDV-Stämme durch eine nichthomologe RNA Rekombination oder durch Punktmutationen während der RNA-Replikation entstehen. Diese Schlussfolgerung basiert auf der Identifikation von zp BVDV spezifischen Genomveränderungen. Zu diesen Veränderungen gehören zelluläre, meisten von viralen Duplikationen flankierte Insertionen, Deletionen, Duplikationen viraler Sequenzen in Kombination mit der Neuordnung des viralen Genoms, kurze virale Duplikationen, deren Leseraster verschoben wurde, und Kombinationen von Punktmutationen (Kümmerer et al., 2000).

Es wurde bisher eine ganze Reihe von Insertionen zellulärer Sequenzen gefunden, darunter häufig eine Insertion, die für Ubiquitin kodiert, so z.B. im BVDV-Stamm Osloss (Meyers et

al., 1989). Neben der für Ubiquitin kodierenden Insertion wurden auch zelluläre Sequenzen inseriert, die für Ubiquitin-ähnliche Proteine wie NEDD8 und SMT3B kodieren (Baroth et al., 2000; Qi et al., 1998). Beim zp Stamm Jasper (JaCP) wurde in das NS2-3 Gen eine Sequenz inseriert, die für „Light chain 3“ (LC3), ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein, kodiert (Abb.1) (Meyers et al., 1998).

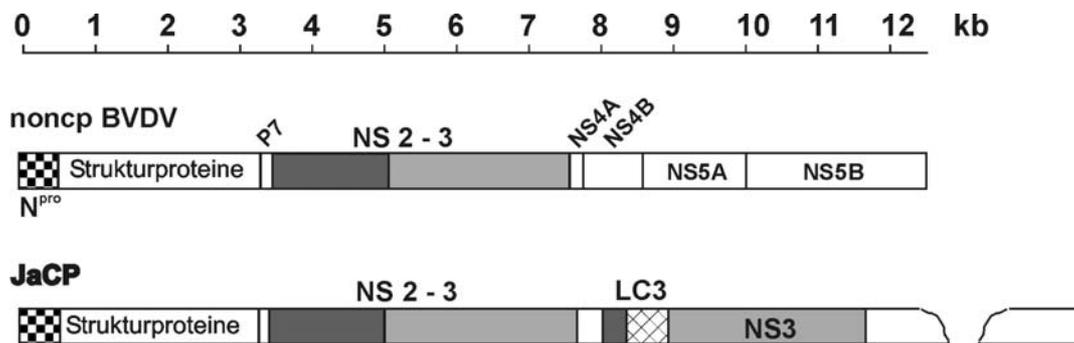


Abb. 1: Genomorganisation von BVDV JaCP, im Vergleich zu der eines ncp BVDV (Meyers et al. 1998). Die offenen Leserahmen der viralen Genome sind als Balken dargestellt. Die Abfolge der vom ORF kodiert ist dargestellt. Auf das Nichtstrukturprotein N^{pro} folgt der Strukturproteinbereich besteht aus der Proteinfolge C, E^{ms} , E1 und E2. Die genomische RNA von BVDV JaCP enthält eine nonvirale Insertion, die für einen Teil von LC3 („light chain 3“) kodiert, ein stöchiometrischer Anteil der Mikotubuli-assoziierten Proteine 1A und 1B (MAP1A/B). Die LC3-Insertion wird von großen Duplikationen viraler Sequenzen flankiert, die die NS3 kodierende Sequenz einschließt. Die zelluläre Insertion induziert die proteolytische Spaltung an ihrem eigenen Carboxyterminus, wobei sie NS3 mit der aminoterminalen Sequenz G P A V C K K generiert. Bei BVD-Viren korreliert die Generierung von NS3 mit dem zp Biotyp.

Neben den Genomveränderungen gibt es ein charakteristisches Merkmal aller zp BVD-Viren: Zellen, die mit zp BVDV infiziert sind, enthalten zusätzlich zum NS2-3 Protein auch NS3. Da dieses Protein nach Infektion mit ncp BVDV nicht auftritt, ist es das Markerprotein für zp BVDV infizierte Zellen (Kümmerer et al., 2000).

Die Korrelation der spezifischen Genomveränderungen bei zp BVD-Virus Stämmen mit der Expression des Markerproteins NS3 läßt vermuten, dass die Genomveränderung letztlich die Generierung dieses Proteins bewirken muss. Dies erfordert die Einführung einer zusätzlichen Spaltstelle in das virale Polyprotein am aminoterminalen Ende von NS3. Im Falle des Stammes Osloss konnte die Beteiligung zellulärer Proteasen, der sog. Ubiquitin-C-terminalen Hydrolasen (UCH's), an der Spaltung zwischen dem carboxyterminalen Ende des Ubiquitins und dem aminoterminalen Ende des Markerproteins NS3 nachgewiesen werden (Tautz et al., 1993). Auch in anderen Fällen konnte der mechanistische Zusammenhang zwischen Genomveränderung und Prozessierung geklärt werden (Kümmerer et al., 2000).

Beim zp BVD-Virus-Stamm JaCP muss der Hypothese folgend die zusätzliche Spaltstelle durch Insertion von LC3 in das virale Polyprotein eingeführt worden sein, und tatsächlich

führt die Deletion des LC3 zum Ausbleiben der Spaltung (Meyers et al., 1998). Die mechanistische Relation zwischen Prozessierung und LC3-Insertion war bisher nicht bekannt. Bei LC3 handelt es sich um eine ca. 16,4 kD große Untereinheit von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAP1A und MAP1B), die zusammen mit Mikrotubuli aufgereinigt werden kann. Die 1,7 kb große mRNA der Ratte kodiert für ein 141 Aminosäuren großes LC3-Protein (Mann und Hammerback, 1994). Homologe LC3-Proteine kommen auch in Säugetierzellen, Pflanzen, *C.elegans* und der Hefe vor (Lang et al., 1998).

Die Funktion von LC3 blieb lange Zeit im Dunklen, bis die Homologie zum Hefeprotein Aut7p/Apg8p entdeckt wurde. Das Hefeprotein Aut7p/Apg8p ist eine unter Hungerbedingungen am Autophagozytoseprozess der Hefe beteiligte Komponente (Lang et al., 1998). Der Autophagozytoseprozess ist ein Überlebensmechanismus, der es der Zelle erlaubt, bei Abwesenheit von Nahrung essentielle Proteine zu synthetisieren. Dazu werden zytosolische Proteine in Autophagosomen nichtselektiv zu den Vakuolen transportiert, um dort abgebaut zu werden und Aminosäuren für die Proteinsynthese zur Verfügung zu stellen. Autophagie ist ein in Hefe durch äußeren Einfluss (Nahrungsmangel) induzierter Prozess. Daneben gibt es in Hefe einen konstitutiven Weg, Proteine selektiv in Vakuolen zu transportieren: den CVT-Weg („cytoplasmic to vacuole transport“) (Klionsky, 1998; Klionsky und Ohsumi, 1999). Beide Transportwege nutzen sehr ähnliche Proteinkomponenten für den Vakuolenimport (Harding et al., 1996; Scott et al., 1996); ein wesentlicher Unterschied ist, dass Autophagie nichtselektiv cytoplasmatische Proteine dem Abbau zuführt, wohingegen der CVT-Weg nach bisherigem Kenntnisstand ausschließlich α -Mannosidase und ungereifte (Vorläufer) Aminopeptidase I (prAPI) in die Vakuole transportiert (Klionsky und Ohsumi, 1999).

Autophagosomen bilden sich im Zytosol an einer subzellulären Struktur, der präautophagosomalen Struktur („preautophagosomal structure“, PAS), aus; eine Komponente dieser Struktur ist Aut7p/Apg8p (Suzuki et al., 2001). Aut7p/Apg8p ist auf unreifen Autophagosomen, isolierten Membranen, Membransackstrukturen und in Aut7p/Apg8p-reichen Regionen nahe der Vakuole nachgewiesen worden. Unter Hungerbedingungen wird die Translation von Aut7p/Apg8p erhöht (Kirisako et al., 1999). In Δ Aut7-Hefestämmen bilden sich unter Hungerbedingungen im Zytosol Vesikel, die schmaler sind als normale Autophagosomen (Kirisako et al., 1999; Lang et al., 1998).

Ein ähnliches Bild ergibt sich bei intragenomischer Deletion von Aut2, einem Gen, das ein für den Autophagosomentransport essentielles Protein kodiert (Aut2p). Aut2p/Apg4p interagiert mit Aut7p/Apg8p und Tubulin (Lang et al., 1998). Es spaltet Aut7p/Apg8p nach

Translation an seinem carboxyterminalen Ende; hierbei wird ein endständiges Glycin generiert. Dieses carboxyterminale Glycin ist wichtig für die Funktion von Aut7p/Apg8p während der Autophagozytose. Neben dieser prozessierten freien Form konnte eine membranassoziierte Form nachgewiesen werden (Kirisako et al., 2000). Durch das Aut7p/Apg8p-Konjugationssystem wird die Aminogruppe von Phosphatidylethanolamin (PE) kovalent an das carboxyterminale Glycin von Aut7p/Apg8p geknüpft. Dabei wird Aut7p/Apg8p zuerst über einen Thioester an Apg7 konjugiert, danach über die gleiche Bindung an Aut1p/Apg3p. Bei Apg7p und Aut1p/Apg3p handelt es sich um Proteine, die in funktioneller Homologie zu Komponenten des Ubiquitinsystems stehen (Ichimura et al., 2000; Noda et al., 2002).

Analog zu Aut7p/Apg8p wird das Säugetier-LC3 ebenfalls nach einem konservierten Glycin carboxyterminal prozessiert. Es entsteht die aktivierte LC3-I Form; die anschließend modifizierte LC3-II Form konnte durch einen Protease-Protektions-Assay an der Oberfläche von Autophagosomen lokalisiert werden (Kabeya et al., 2000). Zwar ist die Modifikation von LC3-II nicht bekannt, aber es ist anzunehmen, dass LC3 eine ähnliche Funktion wie Aut7p/Apg8p einnimmt und deshalb ebenfalls mit einem Phosphoglycerolipid konjugiert wird.

Neben der genauer untersuchten Rolle bei der Autophagozytose besitzt LC3 noch weitere Funktionen, so z.B. bei der Regulation der Translation von Fibronectin (Zhou und Rabinovitch, 1998), dem multiplen Membranumschlag (Aut7p/Apg8p) (Legesse-Miller et al., 2000), dem „Notch signaling pathway“ (Thumm und Kadowaki, 2001) und bei der Regulation der SOS1-Rac1 Signaltransduktion durch die Bindung an die SH-Domäne von SOS1 (Furuta et al. 2002).

Ausgehend von den in den letzten Jahren publizierten Daten ist die Hypothese naheliegend, dass LC3 das Substrat für eine zelluläre Protease ist, die auch das virale Fusionsprotein bestehend aus LC3 und NS3 spalten könnte. Welche Protease diese Spaltung verursacht, war die zentrale Frage, die am Anfang der vorliegenden Arbeit stand. Darüberhinaus sollte der Zusammenhang zwischen der Integration der LC3 kodierenden Sequenz in das virale Genom und der Ausbildung von MD untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Acridinorange (Serva), Acrylamid (AppliChem), Agar bakteriologisch (Difco), Agarose (GibcoBRL), Ammoniumperoxodisulfat (Serva), Ampicillin (Serva), Bacto-Agar (Difco), Bacto-Hefe (Difco), Borsäure (Merck), Bromphenolblau (Serva), BSA (Sigma), Chloroform (Roth), EDTA (Ethyldiamin-tetraessigsäure) (Sigma), Essigsäure (Hoechst), Ethidiumbromid (Merck), Glyoxal (40%) (Fluka), HEPES 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure (Fluka), Minimal SD Base/Gal/Raf (Clontech), PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid) (Sigma), TLCK ("N- α -Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone") (Roche), Tween 20 (Sigma).

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Roche, BRL, Serva, Sigma, Merck, Amersham Pharmacia, Fluka, Bio Rad, Roth bezogen.

2.1.2 Geräte

Anodenkammer SE 6056 (Hoefer; BFAV-Nachbau), Fluoreszenzmikroskop Axiophot (Zeiss), Geltrockner SE 1150 (Hoefer), "Gene Pulser" (Bio Rad), Glasgeräte (Schott), Hybridisierungsschrank Special 10.87 (Bachhofer), Kathodenkammer SE 6054 (Hoefer; BFAV-Plagiat), Kühlischzentrifuge 5402 (Eppendorf), Minifuge 2 (Heraeus), Monitor "Mini Assay type 6-20" (Mini-Instruments), pH-Meter 743 (Bachhofer). "Phospho Imager" (Fujifilm), Röntgenfilmentwicklungsmaschine QX 130 (Konica), Rotor TLA 45 (Beckmann), „semidry-blot“ Apparatur TE80 (Hoefer), Sterilbank Lamin Air HLP 2472 GS / HB 2472 (Heraeus), Tischultrazentrifuge TL-100 (Beckmann), Tischzentrifuge 5415 C (Eppendorf), Transilluminator 254 nm (Bachhofer), TRIO-Thermoblock (Biometra), Ultrospec (Pharmacia), Vakuumtrockenofen (Heraeus).

2.1.3 Verbrauchsmaterial

Einmalspritzen 1 ml (Braun), Filterpapier „Blotting“-Papier MN827B (Macherey-Nagel), Gewebekulturschalen „Cellstar“ 94/16 mm (Greiner), Gewebekulturschalen „easy grip“ 35 x 10 mm (Falcon), Glasfaserfilter GF/C (Whatman), Nitrozellulosemembran ProtranBA83 (Schleicher & Schuell), NucleoSpin Extract (Macherey-Nagel), Nylonmembran Duralon-UV (Stratagene), Nylonmembran Hybond-N (Amersham Pharmacia), Petrischalen 94 mm (Greiner), Petrischalen 145 mm (Greiner), Polaroid-Filme 665 (Polaroid), Polyallomer Zentrifugenröhrchen (Beckmann), Reaktionsgefäße 1,5 ml (Eppendorf), Röntgenfilme BioMax MR und X-OMAT AR (Kodak).

2.1.4 Vorgefertigte Systeme („Kits“)

"Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit" V1.0 V1.1 V3.0 V3.1 (Abi Prism Perkin Elmer), Größenmarker DNA „1 kb Plus DNA Ladder“ (Gibco), Größenmarker RNA „0,24-9,5 kb RNA Ladder“ (Gibco), „Nick Translation Kit“ (Amersham Pharmacia), „One-Step RT-PCR Kit“ (Qiagen), "Protease Inhibitors Set" (Roche), „Rabbit Reticulocyte Lysate System, Nuclease Treated“ (Promega), „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen), „SuperFect Transfection reagent“ (Qiagen), Supersignal (Pierce), „Wheat Germ Extract“ (Promega).

2.1.5 Synthetische Oligonukleotide (Gibco)

Tab. 1: Oligonukleotide zur Verwendung bei Arbeiten mit pEX- a/c¹Δx²

Bezeichnung: Ol-a/c ¹ Δx ²	Nukleotidsequenz	Polarität
Ol-aΔ0	gggggatcctaaggaaaaccttc	+
Ol-aΔ7	gggggatcctaaggaccttcgaacaaagagtag	+
Ol-aΔ21	gggggatcctaaggcagcatcctacaaaatccc	+
Ol-aΔ28	gggggatcctaagggtataatagaacaaagg	+
Ol-aΔ38	gggggatcctaaggcagcttctgtctctgg	+
Ol-cΔ0	ggggggccctccaaaagtctctg	-
Ol-cΔ5	ggggggcccagaggcgtataccgtatacag	-
Ol-cΔ18	ggggggccctcgtttcatacacttcaac	-

¹ Hier und im Folgenden: entsprechende aminoterninale oder carboxyterminale Verkürzung

² Hier und im Folgenden: Anzahl der deletierten Aminosäuren

Tab. 2: Oligonukleotide zur Verwendung bei Arbeiten mit pEX- AS³_P_x⁴

Bezeichnung: Ol-AS ¹ _P _x ²	Nukleotidsequenz	Polarität
Ol-A_P ₂ '	ggggctgcagcccctccaaaagtctcc	-
Ol-V_P ₁ '	ggggctgcaggcactccaaaagtctcc	-
Ol-Q_P ₁ '	ggggctgcagggtgtccaaaagtctcc	-
Ol-W_P ₁ '	ggggctgcaggccatccaaaagtctcc	-
Ol-R_P ₁ '	ggggctgcaggcctccaaaagtctcc	-
Ol-E_P ₁ '	ggggctgcaggctctccaaaagtctcc	-
Ol-R_P ₁	gggctgcaggcctcgaaaagtctcctg	-
Ol-E_P ₁	gggctgcaggcctccaaaagtctcctg	-
Ol-P_P ₁	gggctgcaggcctggaaaagtctcctg	-
Ol-C_P ₁	gggctgcaggcccgcaaaagtctcctg	-
Ol-F_P ₁	gggctgcaggcccgcaaaaagtctcctg	-
Ol-A_P ₁	gggctgcaggcccgcaaaagtctcctg	-
Ol-T_P ₂	gggctgcaggcctccagtagtctcctg	-
Ol-S_P ₂	gggctgcaggcctccagaagtctcctg	-
Ol-R_P ₂	gggctgcaggcctccacgagtctcctg	-
Ol-C_P ₂	gggctgcaggcctccacaagtctcctg	-
Ol-H_P ₂	gggctgcaggcctccatgagtctcctgag	-
Ol-A_P ₂	gggctgcaggcctccagcagtctcctgag	-
Ol-W_P ₂	gggctgcaggcctccccaagtctcctgag	-
Ol-E_P ₂	gggctgcaggcctcctcagctcctgag	-
Ol-C_P ₂	gggctgcaggcctccaaaactcctgag	-

³ Hier und im Folgenden: entsprechender Aminosäure(AS)-austausch

⁴ Hier und im Folgenden: Position x des Aminosäureaustausch in der Spaltstelle

Tab. 3: Oligonukleotide zur Verwendung bei Arbeiten mit pSK-cLC3

Bezeichnung	Nukleotidsequenz	Polarität
Ol-Alpha6S	gggcatgtaggcaacctaggagagg	+
Ol-Alpha6AS	gggctcgagccatcctaggtgtctagatcac	-
Ol-TASS4	gggctcgagatgccgtccgagaaaaccttc	+
Ol-TAASEU	gggaagcttcacagataatttcattccaaaagtc	-
Ol-FRICKE01	tcgaggtaagcctatccctaaccctctcctcggctcgtctcattctacgg	+
Ol-FRICKE02	tcgaccgtagaatcgagaccgaggagagggttagggataggcttacc	-

Tab. 4: Oligonukleotide zur Verwendung bei Arbeiten mit pSK-LC3 und pSK-LC3Δ

Bezeichnung	Nukleotidsequenz	Polarität
Ol-pskpep6	gggctcgagatgtaggcaacctaggag	+
Ol-pskrevns3	gggagcttgtaacctgtgtgctctgg	-

Tab. 5: Oligonukleotide zur Verwendung bei Arbeiten mit pLexAII, pLex-B/LC3 und pLex-B/LC3Δ

Bezeichnung	Nukleotidsequenz	Polarität
Ol-LexA	ggggaattcatggaagaagaagagagcaagg	+
Ol-LexARev	gggctcgagtcagttaacctgtgtgctctgg	-

Tab. 6: Oligonukleotide zur Verwendung bei Arbeiten mit bAut2B1

Bezeichnung	Nukleotidsequenz	Polarität
Ol-ProtIjf	ggggaattcgacacaggctggggctgcat	+
Ol-Prot-jf	gggggatcccctccgatgtcggccaggact	-
Ol-JF+1	gtggtgatggcggatatacaggag	+
Ol-RNABI	ccatcgatctgcaggatatttttttttttttttt	-
Ol-JF+2	gacgtcaacgcggcctacgcg	+
Ol-RNABII	ccatcgatctgcaggatatac	-
Ol-ProI	gggtcagtcggcggccggactgg	+
Ol-JFREVI	cagccagcttcttgaggacttgg	-
Ol-Uff	gggctcgagagcgaagatggacgcagctac	+
Ol-war	ggggaagcttgccgaagccgctctgcgcg	-
Ol-AD1	ggggaattcatggacgcagctacccttacctacg	+
Ol-REVN1PB	gggctcgaggcttctggctctgaactg	-

Tab. 7: Oligonukleotide zur Verwendung bei Arbeiten mit bAut2B2 und cAut2B

Bezeichnung	Nukleotidsequenz	Polarität
Ol-Uff	gggctcgagagcgaagatggacgcagctac	+
Ol-NDaII	gggctcgagtcaaaggacaggatttcaag	-
Ol-M1PB	gggaagcttatggacgcagctacccttacctacg	+

Tab. 8: Oligonukleotide zur Verwendung bei Arbeiten mit bAut2A

Bezeichnung	Nukleotidsequenz	Polarität
Ol-Aut1	aggatgacagctggagaatggag	+
Ol-AutREVIII	cagacctcaagttgagttcccag	-
Ol-M2PB	gggaagcttatggagtcagtttatccaagtatg	+
Ol-REVN2PB	ggctcgaggtgagttcccagtatcctatag	-

Tab. 9: Oligonukleotide zur Verwendung bei Arbeiten mit Jasperisolaten

Bezeichnung	Nukleotidsequenz	Polarität
Ol-BVDV32	aaatctctgtgtacatggcacatg	+
Ol-B32II	ccaagtcctgtgctgttccc	+
Ol-B22.1R	gttgacatggcattttctgtg	-
Ol-JasIns1	gggattttgtaggatgc	-
Ol-JasIns2	gtagaagatgtccgact	+
Ol-LSIV	gggggatcctaaggcagcatcctacaaaa	+
Ol-Jas-jf	ctgtgatcttcttacacacgg	-

2.1.6 Angewandte Plasmide

DH-EB (erhalten von Dr. Beer, BFAV Riems), pBluescript II-SK/KS (Stratagene), pCITEa,b,c (AGS, Heidelberg), pEX7 und pEX7/JaCP (erhalten von Dr. Meyers), pLexA (Clontech), pSinRep5 (erhalten von Prof. Dr. Thiel, Universität Giessen), pYES2 (Invitrogen).

2.1.7 Bakterienstämme und Bakteriophagen

E. Coli XL 1-Blue (Stratagene) und die Helferphage R408 (Stratagene).

2.1.8 Enzyme

Alkalische Phosphatase (Roche), DNase I (Amersham Pharmacia), DNA Polymerase I, Klenowfragment (New England Biolabs), Pfu DNA Polymerase (Stratagene), Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs; Takara), RNasin (Amersham Pharmacia), T7-RNA-Polymerase (New England Biolabs), T7-RNA-Polymerase (Stratagene), T4-DNA-Ligase (New England Biolabs; Takara), Taq-DNA-Polymerase (Appligene).

2.1.9 Radioaktive Substanzen

- α [³⁵P] dCTP (3000 Ci/mmol, 1000mCi/ml; ICN)
- [³⁵S] Trans-Label (1000 Ci/ mmol, 10 mCi/ml; ICN)
- L-[³⁵S]-Methionin (1175 Ci/mmol, 10 mCi/ml; ICN)

2.1.10 Serologische Reagenzien

- Monoklonaler Mausantikörper anti-LexA (Clontech)
- Polyklonaler Kaninchenantikörper anti-Oberflächenproteine-Sindbis-Virus wurde von Herrn Dr. Enzmann (BFAV Tübingen) zu Verfügung gestellt

- Ziege-anti-Kaninchen IgG, FITC-konjugiert (Dianova)
- Kaninchenserum pep6 gegen synthetisches Peptid (BVDV CP7: AS 1571-1586; Tautz et al., 1996), hergestellt von Dr. R. Stark (Universität Giessen)
- Kaninchenserum A3 gegen bakterielles Fusionsprotein (CSFV Alfort: AS 1750-2349; Thiel et al., 1991)
- Ziege-anti-Kaninchen IgG, PO-gekoppelt (Dianova)

2.1.11 Virusstämme

- Rekombinantes Vacciniavirus, Stamm Ankara, T7-Polymerase exprimierend (MVA-T7): erhalten von Dr. B. Moss (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA)

2.1.12 Zellkulturmedien

Zellkulturmedium für BHK-, HFB-R-, und MDBK-Zellen:

BFA 34T: Dulbecco's Modifikation von Eagle's Medium (DMEM) mit folgenden Zusätzen: 0,0178 g/l L-Alanin, 0,03 g/l L-Asparaginsäure, 0,07 g/l Glycin, 0,075 g/l L-Glutaminsäure, 0,025 g/l L-Prolin, 0,1 mg/l Biotin, 0,025 g/l Hypoxanthin und 3,7 g/l NaHCO₃.

Zellkulturmedium für RTG-Zellen:

Minimal Essential Medium (MEM) mit 0,014M Hepes.

Zellkulturmedium für AA-Zellen:

BFA 37: Minimal Essential Medium (MEM) mit nicht essentiellen Aminosäuren (NEAA).

Zu den Medien wurden vor Gebrauch 10 % fötales Kälberserum, 0,128 g/l Penicillin und 0,0599 g/l Streptomycin zugegeben.

Markierungsmedium: DMEM (Gibco), ohne C und M.

2.1.13 Zellen

- *Saccharomyces Cerevisiae* egy 48: erhalten von Dr. W. Fuchs (BFAV Riems)
- RTG #Rie88 („Rainbow trout, Gonadal tissue“): bezogen von Dr. P. Enzmann (BFAV Tübingen)
- MDBK („Marbin Darby Bovine Kidney“): bezogen von der American Type Culture Collection (ATCC CCL 22)
- BHK-21 („baby hamster kidney cells“) (BFAV Tübingen)
- AA C6/36 (*Aedes Albopictus*): erhalten von Dr. F. Käsermann und Dr. C. Kempf (Universität Bern, Schweiz)
- HFB-R CCLV #Rie0182 (embryonale Hühnerfibroblasten): bezogen von Dr. Riebe (BFAV Riems)

2.2 Methoden

2.2.1 Gewebekultur

BHK-, MDBK- und HFB-R-Zellen wurden in BFA 34 T bei 37 °C und 7 % CO₂ in feuchter Atmosphäre kultiviert. Die Kultivierung von RTG-Zellen erfolgte mit MEM + Hepes bei 20 °C und 5 % CO₂ unter Standardatmosphäre. AA-Zellen wurden in BFA 37 bei 28 °C und 5 % CO₂ gehalten.

Alle verwendeten Medien enthielten zusätzlich 10 % fötales Kälberserum (FKS) und 0,1 % Penicillin/Streptomycin (200 mg/ml).

Durch Behandlung mit 1-5 ml Trypsinlösung wurden die Zellen alle 4-6 Tage von den Kulturbehältern abgelöst und trituriert. Die Zellen wurden dann in Abhängigkeit der Verwendung in geeigneter Verdünnung in ein neues Zellkulturbehältnis transferiert.

Trypsinlösung: 2,5 g/l Trypsin, 8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 0,2 g/l KH₂PO₄ x 2H₂O, 1,44 g Na₂HPO₄ x 2H₂O, 1,25g EDTA Na₂ x 2H₂O, 0,016 g/l Phenolrot.

2.2.2 Passagierung von Virusüberständen

Zur Infektion von RTG-, BHK-, HFB-R- und AA-Zellen mit rekombinantem Sindbis-Virus wurden die Zellen in Gewebekulturschalen („Falcon easy grip“ 35 x 10 mm) subkonfluent angezogen. Es wurde 10 % (v/v) Virusüberstand zu dem Zellmedium der zu infizierenden Zellen passagiert und bei gleichen Bedingungen wie die Anzucht weiter inkubiert. Als Indikator der Inkubationsdauer diente der bei infizierten BHK auftretende zytopathogene Effekt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS konnten BHK-, HFB-R- und AA-Zellen nach 24 h, RTG-Zellen nach 72 h geerntet bzw. zur Kontrolle fixiert werden.

2.2.3 Immunhistochemie

2.2.3.1 Chemische Fixierung

Die Zellen, wie unter beschrieben, wurden einmal mit 80 % Aceton gewaschen und anschließend für 30 min in 80 % Aceton fixiert, danach luftgetrocknet.

2.2.3.2 Indirekte Immunfluoreszenz

Die Aceton fixierten Zellen wurden in PBS rehydriert und 1 h bei 37°C in einer Feuchtkammer mit dem ersten Antikörper (Dr. Enzmann α -Sindbis Oberflächenproteine 1:1000) inkubiert. Nach Absaugen der Antikörperlösung wurden die Präparate 3 mal mit PBS gewaschen und anschließend mit dem zweiten Antikörper (α -Kaninchen IgG FITC konjugierter Antikörper 1:5000) in PBS 1 h bei 37°C in feuchter Atmosphäre inkubiert. Die Präparate wurden 3 mal mit PBS gewaschen, überschüssiger Puffer wurde abgesaugt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axiophot, Zeiss) wurde die spezifische Fluoreszenz der mit Sindbis-Virus infizierten Zellen überprüft.

2.2.4 Transiente Expression im „Vaccinia Virus-T7-System“

Subkonfluent angewachsenen BHK-Zellen („Falcon easy grip“ 35 x 10 mm) wurden einmal mit BFA34T ohne FCS gewaschen und anschließend in BFA34T mit MVA-T7 (m.o.i. >1) infiziert. Nach einer Infektionszeit von 1 h bei 37 °C wurde der Zellkulturüberstand durch den zuvor angesetzten Transfektionsansatz ausgetauscht. Der Transfektionsansatz besteht aus

einem Gemisch von 2 µg Plasmid-DNA, 75 µl BFA34T ohne FCS und 10 µl „SuperFect Transfection reagent“ (Qiagen), das 7 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 600 µl BFA34T aufgefüllt wurde. Die transfizierten Zellen wurden 4 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2 x mit Markierungsmedium (DMEM ohne Cystein und Methionin) gewaschen. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37 °C wurde das Medium durch mit 125µCi [³⁵S] Trans-Label ([³⁵S] Methionin/[³⁵S] Cystein) ergänztes Markierungsmedium ausgetauscht. Die Zellen wurden über 4 h bei 37 °C markiert, anschließend 2 x mit PBS gewaschen und bis zur Extraktion der Antigene für die Radioimmunpräzipitation auf – 20 °C gelagert.

PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,7 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O, 1,5 mM KH₂PO₄ x 2H₂O, 0,7 mM CaCl₂ x 2H₂O, 0,5 mM MgCl₂ x 6 H₂O, pH 7,2.

2.2.5 Expression mit Hilfe des pSinRep5-Systems

2.2.5.1 pSin-RNA-Transfektion von BHK-Zellen

BHK-Zellen wurden in Gewebekulturschalen (94/16 mm; Greiner Cellstar) bis zu einer Dichte von 90 % angezogen. Die Zellen wurden trypsiniert, einmal mit BFA 34 T + FCS gewaschen und bei 1000 Upm (Heraeus Minifuge 2) 5 min abzentrifugiert. Im Anschluß wurden die Zellen einmal mit PBS-A gewaschen, und nach erneuter Zentrifugation mittels PBS-A (1,5 ml) auf einen Zellgehalt von ca. 1x10⁷ eingestellt.

Der für die Elektroporation verwendete „Gene Pulser“ von Biorad wurde wie folgt eingestellt: 200Ω, 25µF und 1500V. Verwendet wurden 0,4 cm Küvetten von Bio Rad (Katalognummer: 1652088). Nach Zugabe des RNA-Transkriptionsansatzes zu einem Drittel der Zellen (500 ml) wurden die Zellen in der Küvette zweimal gepulst. Nach fünf Minuten Inkubation der Zellen in der Küvette wurden die transfizierten Zellen in 35 x 10 mm Gewebekulturschalen (Falcon) mit Wachstumsmedium BFA34T überführt. Der erste Überstand wurde nach 20 h auf 70°C eingefroren und anschließend bei 1200 Upm 3 min (Eppendorf Zentrifuge 5415C) abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf RTG- (Fisch), BHK- (Hamster), AA- (Mosquito) und HFB-R-Zellen (Huhn) passagiert.

2.2.5.2 Herstellung von Gesamtproteinextrakten aus Sindbis infizierten Zellen

Mit Sindbis-Virus infizierte BHK-, HFB-R- und AA-Zellen wurden nach 24 h, RTG-Zellen nach 72 h zweimal mit PBS gewaschen und in 150 µl Probenpuffer 5 min bei 70 °C lysiert. Das Lysat wurde durch SDS PAGE aufgetrennt.

Probenpuffer: M Urea, 5 % (w/v) DS, 40 mM Tris-HCL pH 6,8, 0,1 mM EDTA, 0,4 mg/ml.

2.2.6 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.2.6.1 Plasmid-Maxi-DNA-Isolierung

Die Plasmid-Maxi-Isolierungen wurden mittels Anionenaustauschersäulchen (Nucleobond AX100) durchgeführt. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte nach Angaben des Herstellers (Macherey-Nagel). In der Regel wurde für die Plasmid-Isolierung eine frische 50 ml Bakterienübernachtskultur verwendet. Die nach dieser Methode aufgereinigte DNA wurde in 80-200 µl H₂O aufgenommen und spektralphotometrisch gemessen.

2.2.6.2 Plasmid-Mini-DNA-Isolierung

Für die Analyse von Klonierungsprodukten wurden kleine Plasmidpräparationen nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) hergestellt. 1,5 ml Bakteriensuspension einer 5 ml *E. Coli*-Übernachtskultur in LB-Medium wurde bei 3000g für 5 min abzentrifugiert. Der Zelleniederschlag wurde in 100 µl Lösung I resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl Lösung II und 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Bakterien lysiert. Nach Zugabe von 150 µl Neutralisierungspuffer (Lösung III) wurde das Lysat 5 min auf Eis inkubiert. Die Zentrifugation diente der Beseitigung von denaturierten Proteinen und chromosomaler DNA und erfolgte bei 10000 g für 10 min. Die Überstände wurden abgenommen und die Plasmid-DNA mit 0,7 Volumen Isopropanol gefällt. Der DNA-Niederschlag wurde in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet und anschließend in 30 - 50 µl H₂O aufgenommen.

Lösung I: 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10mM EDTA, 50 mM Glukose.

Lösung II: 0,2 M NaOH, 1 % Triton X-100.

Lösung III: 3 M NaAc, pH 4,8.

2.2.6.3 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäurelösungen

Die Konzentration einer Nukleinsäurelösung wurde durch die Bestimmung der Absorption bei $\lambda = 260$ nm in einer Küvette mit einer Schichtdicke von 1 cm ermittelt (Lambert Beer'sches Gesetz). Die Absorptionen A_{260} und A_{280} wurde mit dem Spektralphotometer (Ultrospec, Pharmacia) gemessen. Es gelten folgende Annäherungen:

$$A_{260} = 1 \approx 50 \mu\text{g dsDNA/ml}$$

$$A_{260} = 1 \approx 40 \mu\text{g RNA/ml}$$

Der Quotient A_{260}/A_{280} ist ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäurepräparation. Werte, die unter 1,8 liegen, deuten auf eine Verunreinigung durch Proteine hin.

Geringe DNA-Mengen wurden in Ethidiumbromid gefärbten Agarosegelen mit Hilfe von Mengenstandards abgeschätzt.

2.2.6.4 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um die Selbstligation von geschnittenen Vektoren mit kompatiblen Enden zu verhindern, wurde der 5'-Phosphatrest mit Hilfe von CIAP („calf intestinal alkaline phosphatase“) entfernt. Die linearisierte DNA (0,5 µg - 2 µg) wurde mit 10 x CIAP-Puffer bis zur 1 x Konzentration und 0,5 µl CIAP (Roche) versetzt. Zur Abtrennung des Enzyms wurde die Vektor-DNA über Säulchen (NucleoSpin Extract, Machery-Nagel) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

2.2.6.5 Herstellung von glatten DNA-Enden

Um nicht kompatible Überhänge an Restriktionsfragmenten zu beseitigen, wurden mit Hilfe des Klenow-Fragments (3'-5'-Exonukleaseaktivität) 3'-Überhänge abgebaut und 5'-Überhänge aufgefüllt. Hierzu wurde der Restriktionsverdau mit einer dNTP-Mischung (0,25 mM Endkonzentration) und 0,5 µl Klenowfragment (NEB; ca 1 U/µg DNA) versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert.

2.2.6.6 Agarose-Gelelektrophorese (DNA)

Die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte wie beschrieben (Sambrook et al., 1982) in 0,7-1,2 % Agarosegelen in 1 x TAE-Puffer pH 7,8 und 0,001 % Ethidiumbromid (1%ige Lösung in H₂O). Laufpuffer und Gelpuffer waren identisch. Die Gele wurden in Flachbett-Gelapparaturen verschiedener Größe gegossen. Die zu trennende DNA wurde mit ca. $\frac{1}{10}$ Volumen 10 x DNA-Probenpuffer (Orange G) versetzt und geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei ca. 11,5 V/cm. Als Längenstandard wurde parallel 1kb-Ladder (Gibco) aufgetrennt. Die Gele wurden im UV-Durchlicht bei 254 nm betrachtet und fotografiert (Fotoapparatur MP4, Polaroid).

DNA-Probenpuffer (Orange G): 0,125 % (w/v) Orange G, 15 % (w/v) Ficoll 400, 5 x TAE.

50 x TAE-Puffer: 2 M Tris, 0,25 M CH₃COONa x 3H₂O, 0,05 M EDTA, pH 7,8.

2.2.6.7 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die mit Ethidiumbromid gefärbten DNA-Banden wurden unter UV-Bestrahlung (302 nm) sichtbar gemacht und ausgeschnitten. Die Extraktion wurde mit „NucleoSpin Extract-Kit“ (Machery-Nagel) durchgeführt. Das „NucleoSpin-System“ beruht auf der Auflösung der Agarose-Matrix durch chaotrope Ionen (ClO₄⁻-Ionen) und anschließender Bindung der DNA an eine Silikatsäule unter Hochsalzbedingungen. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Elution erfolgte mit 30 - 50 µl H₂O.

2.2.6.8 Ligation

Isolierte DNA-Fragmente wurden mit 0,5 µl T4-DNA-Ligase (NEB; 2-3 Weiss units) in 1 x T4 DNA-Ligase Puffer in einem Volumen von 20 µl ligiert. Die Inkubation des Ligationansatzes erfolgte 4 h lang bei 22 °C oder über Nacht bei 15 °C. Die Ligation von Inserts mit kohäsiven Enden und Vektoren erfolgte in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:2, 1:5 und 1:10. Das Verhältnis Vektor zu Insert für die Ligation glatter Enden wurde in Annäherung wie folgt berechnet (Dugaiczky et al., 1975):

$$M = 2 \times 10^{-10} \times (48,5 / \text{Produkt-Größe in kb})^{3/2}$$

$$c(\text{Insert}) = 2 \times M \times 650 \times \text{Insert-Größe (bp)} [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$$

$$c(\text{Vektor}) = M \times 650 \times \text{Vektor-Größe (bp)} [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$$

1 x Ligase-Reaktionspuffer: 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 25 µg/ml BSA, (pH 7.5 @ 25°C).

2.2.6.9 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente wurde die PCR-Methode eingesetzt. Die PCR („polymerase chain reaction“) basiert auf der 5'-3'-Polymeraseaktivität einer thermostabilen DNA-Polymerase. Durch mehrfache Wiederholung des PCR-Zyklus, mit Denaturierung der doppelsträngigen DNA, Anlagerung und Verlängerung der Primer, wird das zu vervielfältigende DNA-Fragment bis zum Erreichen der Sättigungskonzentration exponentiell mit der Anzahl der durchgeführten Zyklen vervielfältigt. Die optimale Anlagerungstemperatur (T_p) wurde wie folgt berechnet:

$$T_p = 0,22 + 1,46 (I_n); I_n = 2 \times (\text{Anzahl von G oder C}) + (\text{Anzahl von A oder T})$$

Die Gleichung gilt für Oligonukleotide mit einer Länge von 20 bis 35 Basen.

Die PCRs wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl bzw. 20 µl in einem 500 µl Dünnwandreaktionsgefäß (Eppendorf) durchgeführt.

Bei der chronologischen Erfassung von Rekombinaten aus Jasper vor Ausbruch von MD wurde für die zweite PCR die Taq-Polymerase (QBiogene) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Anlagerungstemperatur der Primerkombination OI-LCSIV/OI-Jas/JF betrug 56 °C; die Amplifikationszeit je Zyklus 50 s.

Für alle anderen PCRs wurde die Pfu-Polymerase (Stratagene) nach Angaben des Herstellers verwendet (Standard-PCR-Pfu-Programm: (95 °C 45 s, T_p °C 45s, 72 °C 1 min pro 1 kb) x 30 Zyklen; 72 °C 10 min; 4 °C Pause).

2.2.6.10 Reverse Transkription (RT-PCR)

Um cDNA mit Hilfe einer PCR zu amplifizieren, lässt man einen Primer an die RNA-Matrize hybridisieren und erstellt mittels der Reversen Transkriptase (RT) und einer PCR eine cDNA-Kopie (Newton und Graham, 1994). Die RT-PCR wurde mit „Qiagen One-Step RT-PCR Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die RT-PCRs der Jasperisolate wurden mit den in Tab. 9 aufgeführten Oligonukleotiden wie beschrieben durchgeführt (Fricke et al., 2001).

2.2.6.11 Isolierung von Gesamtzell-RNA

Die RNA wurde mit dem RNeasy-Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers gereinigt und konzentriert. Die Elution erfolgte mit DEPC-behandeltem H₂O. Die mRNA-Konzentration wurde durch die Messung der OD₂₆₀ bestimmt. Bei allen Arbeiten wurden Handschuhe getragen und die üblichen Schutzmaßnahmen eingehalten, um RNase-frei zu arbeiten.

2.2.6.12 Isolierung von Gesamt-RNA aus Jasper-Rinderserum

100 µl Serum wurden mit „TriFast-Reagenz“ nach Anleitung des Herstellers (PeqLab) aufgearbeitet.

2.2.6.13 Auftrennung von RNA durch Agarosegelelektrophorese

Um RNA ausschließlich nach Größe aufzutrennen, wurde zuvor eine Behandlung mit Glyoxal durchgeführt, und ein denaturierendes Formaldehygel verwendet, um intramolekulare Rückfaltung der RNA zu verhindern.

Gelprotokoll: Bei Verwendung eines 1%igen Agarosegels wurden 1,5 g Agarose in 140 ml H₂O aufgekocht, mit 3 ml 50 x Phosphatpuffer versetzt, und nach Abkühlen 21 ml einer 36,5%igen Formaldehydlösung eingerührt. Die Gelkammer (horizontal 14 x 25 cm) wurde ausgegossen und nach Abkühlen des Gels mit 1 x Phosphatpuffer befüllt.

50 x Phosphatpuffer: 250 mM Na₂HPO₄xH₂O, 250mM NaH₂PO₄xH₂O, pH 6,8 (mit NaOH einstellen).

Probenbehandlung: Ein Gemisch aus 1-7 µg zellulärer RNA, 3 µl 5 x Phosphatpuffer und 1,8 µl Glyoxal wurde mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 12 µl aufgefüllt und 35 min bei 56 °C denaturiert. Die Proben wurden mit 3 µl RNA-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen gegeben. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 120 V (4,8V/cm) über 4 h unter Umwälzung des 1 x Phosphatpuffers. Als Längenstandard wurde parallel „0,24-9,5 RNA-Ladder“ (Gibco) aufgetrennt.

Glyoxal: 8,8 M Glyoxal (40% in H₂O) mit SERDOLIT MB-1 entionisieren.

RNA-Probenpuffer: 0,125 % (w/v) Orange G, 15 % (w/v) Ficoll 400, 5 x TAE.

Gelfärbung: Im Anschluß der Auftrennung wurde die RNA im Gel mit einer Acridinorange-Lösung 3 min gefärbt. Das Gel wurde 1 x 20 min in 1 x Phosphatpuffer entfärbt und im UV-Durchlicht (254 nm) mit einer Polaroid-Kamera abfotografiert.

2.2.6.14 Transfer von RNA („Northern Transfer“)

Die auch als „Northern Blotting“ bezeichnete Methode dient dazu, die nach Größe getrennte Gesamtzell-RNA aus Agarose-Gelen auf Membranen zu immobilisieren. Die RNA wurde mit 20 x SSC als Transferlösung für die Dauer von 12 h über einen kapillaren Aufwärtstransfer auf eine Nylonmembran (Duralon-UV, Stratagene) transferiert (Sambrook et al., 1989). Nach dem Transfer wurde die Membran in 3 x SSC gewaschen. Zur Bindung der RNA an die Nylonmembran und zur Denaturierung des Acridinorange wurde die luftgetrocknete Membran 4 h bei 80 °C im Vakuum gebacken.

Durch Hybridisierung mit einer markierten RNA-Sonde können dann spezifische Transkripte identifiziert werden.

20 x SSC: 3 M NaCl, 0,3 M Natrium-Citrat x 2 H₂O, pH 7,0 (mit NaOH einstellen).

Acridinorange-Lösung: 50 µg/ml Acridinorange (ansetzen in 1 x Phosphatpuffer).

2.2.6.15 Herstellung von radioaktiven DNA-Sonden durch „Nick“-Translation

Radioaktive DNA-Sonden wurden mit einem „Nick-Translation-Kit“ (Amersham) hergestellt. Das Enzym DNase I verursacht in DNA-Doppelsträngen Einzelstrangbrüche, von welchen das Enzym DNA-Polymerase I durch seine 5'-Exonuklease-Aktivität den DNA-Einzelstrang abbaut. Der komplementäre Strang dient diesem Enzym gleichzeitig als Matrize zum Auffüllen des Strangs unter Verwendung der radioaktiv markierten Base (α [³²P]dCTP).

Ca. 50 ng des zu markierenden DNA-Fragments wurden mit 4 µl Nukleotid-Pufferlösung (nach Herstellerangaben), 3 µl α [³²P]dCTP (3000 Ci/mmol) und 2 µl Enzymlösung und mit H₂O auf 20 µl aufgefüllt und 90 min. bei 15°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 80 µl TES (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM EDTA, 0,5 % SDS) gestoppt. Die freien Nukleotide wurden durch Zentrifugation über eine Sephadex-G50-Säule (Pharmacia) abgetrennt. Nach Messung der radioaktiven Markierung per Monitor (Mini Assay type 6-20, Mini-Instruments) wurde die Sonde 3 min bei 95°C inkubiert, um DNA-Einzelstränge zu generieren, bevor die Sonde in die Hybridisierlösung gegeben wurde.

2.2.6.16 Aufreinigung radioaktiv markierter DNA-Sonden

Mit Hilfe der Gelfiltration wurden freie Nukleotide von längeren Sondenmolekülen abgetrennt. In 1 x TE gequollenes Sephadex-G50 (Pharmacia) wurde in 1 ml Spritzen mit passenden Glasfaserfiltern gefüllt. Nach Verdichtung des Gelbetts mittels 2 x 2-minütiger Zentrifugation bei 1000 Upm (Minifuge, Heraeus) erfolgte die Auftragung der Sonde in einem Gesamtvolumen von 100 µl in 1 x TES auf die Säule und die Elution durch erneute 2-minütige Zentrifugation.

2.2.6.17 Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden

Die auf eine Membran transferierte, kovalent gebundene RNA wurde mit einer radioaktiv markierten Sonde hybridisiert.

Hybridisierungslösung: 1 mM EDTA, 250 mM SDS, 250 mM Na₂HPO₄, 250 mM NaH₂PO₄, (pH 7,2).

5% Hybridisierungswaschlösung: 1 mM EDTA, 173 mM SDS, 20 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaH₂PO₄, (pH 7,2).

1% Hybridisierungswaschlösung: 1 mM EDTA, 250 mM SDS, 20 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaH₂PO₄, (pH 7,2).

Nach dem Einlegen der Membranen in Glasröhren erfolgte die Vorhybridisierung mit ungefähr 20 ml Hybridisierungslösung für 30 min bei 68°C in einem Wärmeschrank (Special 10.87, Bachhofer) mit 7-8 Upm. Danach wurde die Lösung abgegossen, durch 10 ml neue Hybridisierungslösung ersetzt und die hitzedenaturierte Sonde zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht. Dann wurden die Filter 1 x mit 5%iger Hybridisierungswaschlösung und 2 x mit der 1%igen Hybridisierungswaschlösung für jeweils 30 min gewaschen. Danach wurden die Membranen getrocknet und ausgewertet.

2.2.7 DNA-Sequenzanalysen

2.2.7.1 Sequenzierung von PCR-Fragmenten und Plasmid-DNA

Die angewandte Sequenzierungsreaktion stellt eine Variante der Kettenabbruchmethode nach Sanger dar (Sanger et al., 1977), wobei Denaturierung, Anlagerung des Primers und Polymerisierung mehrmals mit der zu sequenzierenden DNA ($\approx 0,5 - 1 \mu\text{g}$) als Matrize zyklisch wiederholt werden. Hierbei finden fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide (A, C, G, T) Verwendung. Für die Sequenzierung der DNA wurde „Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ (Abi Prism Perkin Elmer) benutzt. Der Mix wurde nach Angaben des Herstellers verwendet. Für jede zu sequenzierende Probe wurde zunächst ein Reaktionsansatz aus 0,5-1 μg DNA, 4 pM Primer und 3 μl Mix hergestellt und mit H₂O auf 10 μl aufgefüllt.

Die Amplifikation erfolgte mit der PCR-Maschine 9600 von Perkin-Elmer nach folgendem Programm: Je Zyklus 96 °C 10 s, 50 °C 5 s, 60 °C 4 min. Nach 25 Amplifikationszyklen wurde auf 4 °C Lagertemperatur abgekühlt.

Die amplifizierte DNA der Reaktionsansätze wurde durch Zugabe von 25 μl 100%igem Ethanol und 1 μl einer 3 M Natriumacetatlösung pH 4,6 gefällt. Nach Zentrifugation der Proben bei 14000 UpM (Eppendorf 5415) über 20 min wurde mit 140 μl 80%igem Ethanol gewaschen und in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet.

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte mit einem 4,5%igen denaturierenden Polyacrylamidgel. Die Sequenziergelläufe und Auswertungen wurden mit dem „ABI PRISM 377 DNA Sequencer“ (Perkin Elmer) durchgeführt.

2.2.7.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur DNA-Sequenzanalyse

Die Trennung von einzelsträngigen, linearisierten DNA-Molekülen erfolgte in denaturierenden Polyacrylamidgelen nach der Molekülgröße.

Gelpräparation: 7,5 ml 30%ige Acrylamidlösung (29:1 Fertiglösung, BIO-RAD), 6,0 ml 10 x TBE-Puffer, 20 ml H₂O und 18 g Harnstoff wurden gemischt, entgast und mit 350 μl 10 % (w/v) APS (Ammoniumperoxodisulfat) und 15 μl TEMED (N,N,-Tetramethylenethylendiamin) versetzt. Das 0,5 mm dicke Gel wurde horizontal zwischen zwei 36 cm lange aufeinanderliegende Glasplatten gegossen, die anschließend in die Sequenziergelapparatur (Perkin Elmer) eingespannt wurden. Die Platten wurden vorher mit

„Alconox“ (Aldrich) (10 g/l), H₂O und 90%igem Isopropanol gereinigt. Nach dem Gießen wurde sofort der Kamm (36 Spuren) eingesetzt, der nach Polymerisierung des Gels umgedreht wurde, so dass durch die gezackte Seite die Probenkammern gebildet wurden.

Elektrophoresebedingungen: Die Elektrophorese erfolgte vertikal in 1 x TBE-Puffer pH 8,3. Unmittelbar vor dem Gellauf wurden die Probenkammern mit Laufpuffer gespült. Die in 3,5 µl Formamid-Mix aufgenommene Sequenzierproben wurden bei 92 °C für 3 min erhitzt. Je 1,5 µl Sequenzierprobe wurden aufgetragen. Der Lauf wurde bei einer Temperatur von 51 °C bei 2400 V über Nacht (> 10 h) durchgeführt. Die Detektion erfolgte durch Laseranregung der mit R110 (G, blau), R6G (A, grün), TAMRA (T, schwarz) und ROX (C, rot) gekoppelten Didesoxynukleotide im „ABI PRISM 377 DNA-Sequenzier“ (Perkin Elmer).

10 x TBE-Puffer: 500 mM Tris-HCl (pH 8,3), 500 mM Borat, 20 mM EDTA.

Formamid-Mix: 40 µl Ladepuffer (ABI PRISM), 160 µl Formamid.

2.2.8 Mikrobiologische Methoden

2.2.8.1 Bakterienanzucht

Die Bakterien wurden in LB-Flüssigmedium bei 37 °C unter Schütteln angezogen. Plasmidhaltige Bakterien wurden durch Zugabe von 100 mg Ampicillin pro Liter LB-Medium selektioniert.

LB-Medium:

10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl.

LB⁺⁺-Medium: 10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 20 mM MgSO₄, 10 mM KCl.

2.2.8.2 Herstellung kompetenter *E. Coli*

Kompetente *E. Coli* besitzen die Fähigkeit, DNA aus der Lösung aufzunehmen. *E. Coli* (z.B. XL1-Blue) wurden in 100 ml LB⁺⁺ bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen. Nach Zentrifugation der Bakterien bei 3000 Upm (Minifuge 2, Heraeus) bei 4 °C über 10 min wurden die Bakterien in 25 ml eisgekühltem CaCl₂-Puffer resuspendiert. Nach 40 min Inkubation auf Eis wurden die Bakterien nochmals zentrifugiert. Die Bakterien wurden anschließend in 5 ml kaltem CaCl₂-Puffer resuspendiert und weiter 2 h auf Eis inkubiert, danach aliquotiert und bei -70 °C gelagert.

CaCl₂-Puffer: 60 mM CaCl₂, 15 % (v/v) Glycerin, 10 mM Pipes pH 7,1.

2.2.8.3 Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA

50 µl kompetenter *E. Coli*-Bakterien wurden auf Eis aufgetaut (5 min - 1 h), mit 10 µl Ligationsansatz bzw. 10 - 150 ng Plasmid-DNA versetzt und für 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen einem Hitzeschock von 2 min Dauer bei einer Temperatur von 42 °C ausgesetzt, nochmals 1 min auf Eis inkubiert und mit 200 µl LB⁺⁺-Medium versetzt. Darauf wurden die Bakterien 45 min bei 37 °C inkubiert. 50 µl -150 µl der transformierten Bakteriensuspension wurden auf Ampicillin haltige LB-Agarplatten (15 g Agar pro Liter LB-

Medium) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Sichtbare Kolonien wurde zum Animpfen von *E. Coli*-Übernachtskulturen verwendet (Bakterienanzucht).

2.2.9 Hefebiologische Methoden

2.2.9.1 Herstellung kompetenter Hefen und Transformation mit Plasmid-DNA

Kompetente Hefen besitzen die Fähigkeit, Plasmid-DNA aufzunehmen. Hefen vom Stamm *egy 48* wurden über Nacht bis zu einer $OD_{600} > 1,5$ in 50 ml YPD Medium bei 30 °C unter Schütteln bei 250 Upm angezogen. Die Übernachtskultur wurde mit YPD Medium auf eine OD_{600} von 0,2-0,3 eingestellt und bei 30 °C unter Schütteln (230 Upm) angezogen bis zu einer OD_{600} von 0,4. Nach Zentrifugation der Hefen (50 ml) mit 1000g bei Raumtemperatur über 5 min wurden die Hefen in 25 ml sterilem TE-Puffer resuspendiert. Sie wurden dann bei 100 g für 5 min zentrifugiert und in 1,5 ml 1 x TE / 1 x LiAc resuspendiert. Dem Gemisch aus 100 µl dieser Suspension, 1 µg Plasmid-DNA und 0,1 mg Hering-DNA wurde 600 µl PEG/LiAc zugefügt und 30 min bei 30 °C unter schwachem Schütteln inkubiert. Danach wurden 70 µl DMSO zugegeben und gut vermischt, einem Hitzeschock bei 42 °C von 15 min ausgesetzt, anschließend auf Eis für 2 min inkubiert. Die Hefen wurden 5 s bei 14000 Upm (Eppendorf 5415) zentrifugiert, in 500 µl 1 x TE-Puffer aufgenommen und auf SD-Agarplatten bei 30 °C inkubiert.

YPD-Medium: 20 g/l Difco Pepton, 10 g/l Hefeextrakt (Difco), pH 6,5, 2% Glucose (sterile Zugabe nach Autoklavierung).

10 x TE-Puffer: 0,1 M Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7,5.

10 x LiAc: 1 M LiAc, pH 7,5.

Peg 4000: 50 % Polyethylenglykol 4000 (w/v).

2.2.9.2 Herstellung von Hefen für Gesamtproteinextraktion

Die auf Mangelmediumagarplatten (SD-Agarplatten) angewachsenen Hefen wurden in flüssigem SD-Medium über Nacht bei 30 °C unter Schütteln bei 250 Upm angezogen. Die Übernachtskultur wurde mit YPD-Medium auf eine OD_{600} von 0,2-0,3 eingestellt und bei 30 °C unter Schütteln (230 Upm) bis zu einer OD_{600} von 0,4 (4-8 h) angezogen. Anschließend wurden die Hefen in mit Eis gefüllte Zentrifugenbecher überführt und mit 1000g bei 4 °C über 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit eiskaltem H₂O resuspendiert und 5 min mit 1000g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Hefen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert.

SD-Medium: 6,7 g/l SD-Medium + Galactose und Raffinose (Clontech), 100 ml/L Aminosäurelösung ohne Selektionsaminoäure (nach Angabe des Herstellers Clontech), pH 5,8.

SD-Agarplatten: 20 g Agar pro l SD-Medium.

2.2.9.3 Präparation von Gesamtproteinextrakten aus Hefen

Die eingefrorenen Hefen wurden, um sie zu lysieren, mit 60 °C vorgewärmten Lysepuffer und 80 µl Glaskügelchen (425-600 µm, Sigma) versetzt, 10 min bei 70 °C inkubiert und 1 min stark geschüttelt. Für eine Gesamtzell-OD₆₀₀ von 7,5 (OD₆₀₀ x ml Anzuchtmedium) wurden 100 µl Lysepuffer verwendet. Das Lysat wurde mit 14000 Upm (5402 Eppendorf) bei 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß gegeben und im kochenden Wasserbad für 3 min erhitzt. Die Überstände wurden bis zur Auftrennung durch SDS PAGE auf -70 °C gelagert.

Lysepuffer: 8 M Urea, 5 % (w/v) DS, 40 mM Tris-HCL pH 6,8, 0,1 mM EDTA, 0,4 mg/ml Bromphenolblau.

1 ml Lysepuffer wurden vor Gebrauch 10 β-Mercaptoethanol, 50 µl (100 mM) PMSF und 70 µl Protease-Inhibitor-Cocktail (Complete Mini, Roche) zugesetzt.

2.2.10 *In vitro*-Transkription

Die linearisierte Plasmid-DNA (2-4 µg) wurde mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 100 µl eingestellt, mit 100 µl Phenol ausgeschüttelt und 5 min bei 14000 Upm (5415 C Eppendorf) zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde mit 100 µl Chloroform versetzt und zentrifugiert. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe des 2,5 fachen Volumens EtOH und 12 µl 2 M KAc (pH 5,6) bei -70 °C für 30 min inkubiert, aus der wässrigen Phase präzipitiert und mit 14000 Upm (5402 Eppendorf) bei 4 °C für 20 min abzentrifugiert. Nach einem Waschschrift mit 80 % EtOH wurde die DNA getrocknet und in 20 µl H₂O aufgenommen. Es folgte die *in vitro*-Transkription, in einigen Fällen mit Anheften einer 7-Methylguanositium-Kappe.

Mit 7-Methylguanositium-Kappe: Ein Gemisch aus der linearisierten Plasmid-DNA, 5 µl 10 x Sp6 Puffer (Amersham Pharmacia), 0,8 µl BSA (2,95 mg/ml, Amersham Pharmacia), 2,5 µl 10 mM NTP-Mix ohne GTP (Pharmacia), 5 µl mM 7mG(5')ppp(5')G (NEB), 1,2 µl RNasin (1,5 U/µl, Amersham Pharmacia), 10,5 µl H₂O und 1 µl Sp6-Polymerase (50 U/µl, Amersham Pharmacia) wurde für 75 min bei 37 °C inkubiert, danach wurden 2,5 µl 1 mM GTP zugegeben und es wurde weitere 15 min bei 37 °C inkubiert.

Ohne 7-Methylguanositium-Kappe: Ein Gemisch aus der linearisierten Plasmid-DNA, µl 10 x TES-Puffer (NEB), 10 µl 10 mM NTP-Mix, 0,8 µl BSA, 0,5 µl RNasin, 1 µl T7-Polymerase (50 U/µl Stratagene), 1 µl T7-Polymerase (50 U/µl NEB), 11,7 µl H₂O wurde 1 h bei 37 °C inkubiert, danach wurde 1 µl DNase I (10 U/µl, Amersham Pharmacia) zugegeben und weitere 30 min bei 37 °C inkubiert.

Beide Transkriptionsansätze wurden über eine G-50-Säule aufgereinigt. Nach einem weiteren Phenol/Chloroform-Extraktionsschritt wurde die RNA mit EtOH wie zuvor beschrieben präzipitiert und in 20 µl H₂O aufgenommen. Die RNA wurde durch Agarosegelelektrophorese analysiert.

2.2.11 *In vitro*-Translation

Die RNA ohne 7-Methylguanositium-Kappe wurde für die *in vitro*-Translation in RRL („Rabbit Reticulocyte Lysate System, Nuclease Treated“) und WG („Wheat Germ Extract“) nach Angaben des Herstellers (Promega) verwendet. Dabei wurde [³⁵S]-Methionin dem Translationsansatz zur Markierung der zu translatierenden Proteine zugesetzt.

2.2.12 Durchsicht einer bovinen λ -cDNA-Bibliothek

Um die Sequenz der zellulären LC3-mRNA zu erhalten, erfolgte die Durchsicht einer bovinen Milz-cDNA-Lambda-ZAPII-Bibliothek von Stratagene.

2.2.12.1 Plattieren der cDNA-Phagenbank

Für das Plattieren wurde die Phagen-Bibliothek auf eine Konzentration von $1 \times 10^4/\mu\text{l}$ eingestellt. 700 μl XL-1 blue Bakterien ($\text{OD}_{600} = 0,5$ in Φ -LB-Medium + 0,2 % Maltose) wurden nach Maltose-Induktion mit 1×10^4 pfu infiziert und 15 min bei 37 °C inkubiert, danach mit 7 ml vorgewärmter Top-Agarose vermischt und auf eine Φ -LB-Agarplatte (145 mm, Greiner) gegossen. Nach Erstarren der Top-Agarose wurden die Platten bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die zu erwartende Anzahl von Plaques sollte 10000 pro Platte betragen. Um ein statistisches Mittel aller in dieser Bank enthaltenen Gene zu erhalten, wurden 12 solcher Platten angesetzt. Es folgte die Herstellung von Replikas.

Φ -LB-Medium: LB-Medium, 10 mM MgSO_4 .

Φ -LB-Agarplatten: Φ -LB-Medium, 15 g/l Agar.

Top-Agarose: Φ -LB-Medium, 0,8 % Agarose.

2.2.12.2 Anfertigung von Replikas auf Nylonmembranen

Die nummerierte Nylonmembran (132 mm Hybond-N, Amersham Pharmacia) wurde für 30 s auf die Oberfläche der Φ -LB-Agarplatten aufgelegt, und währenddessen wurden für die spätere Orientierung mit einer Kanüle 6 unsymmetrische Löcher eingestanz. Die Membran wurde mit dem Phagen-Abdruck nach oben für 30 s auf die Oberfläche der Denaturierungslösung aufgelegt, anschließend für 30 s auf den Spiegel der Neutralisierungslösung. Die in 3 x SSC gewaschene Membran wurde luftgetrocknet, und die RNA durch UV-Licht an die Nylonmembran immobilisiert. Die Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde erfolgte wie beschrieben.

2.2.12.3 Isolierung positiver Plaques

Positive Plaques wurden ausgestochen und in je 500 μl Φ -SM-Puffer mit 30 μl Chloroform über Nacht inkubiert, wobei die Phagen in die Lösung diffundierten. Diese wurde 1:100 mit Φ -SM-Puffer verdünnt. Davon wurden 5 μl mit 200 μl XL-1 blue Bakterien ($\text{OD}_{600} = 0,5$ in Φ -LB-Medium + 0,2 % Maltose) gemischt, 15 min bei 37 °C inkubiert und zusammen mit 3 ml Top Agarose auf Φ -LB-Agarplatten (94 mm, Greiner) gegossen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Das weitere Vorgehen folgt der Beschreibung zur Anfertigung von Replikas (82 mm Hybond-N, Amersham Pharmacia).

Danach diffundierten die Phagen der ausgestochenen positiven Plaques in je 500 μl Φ -SM-Puffer mit 30 μl Chloroform. Diese Φ -Lösung wurde für die *in vivo*-Exzision verwendet.

Φ -SM-Puffer: 0,1 M NaCl, 0,02M Tris pH 7,4, 0,01 M MgSO_4 .

2.2.12.4 *In vivo*-Exzision

XL-1 blue Bakterien mit einer $\text{OD}_{600} = 0,5$ wurden in Φ -LB-Medium + 0,2 % Maltose angezogenen. Von diesen wurden 400 μl mit 100 μl der Φ -SM-Lösung und 2 μl Helferphage R408 gemischt. Nach 4-5 h Inkubation bei 37 °C unter Schütteln wurden sie einem Hitzeschock bei einer Temperatur von 70 °C und 15 min Dauer ausgesetzt und anschließend 10 min bei 15000 Upm (5415 C Eppendorf) zentrifugiert. Ein Gemisch aus 2 μl dieses

Überstands und 400 µl XL-1 blue Bakterien wurden auf LB-Ampicillin/X-Gal/IPTG-Agarplatten ausgestrichen, die positiven, blau gefärbten Kolonien vermehrt, und die Plasmid-DNA isoliert. Das Insert dieser Plasmide wurde durch Restriktionsendonukleaseverdau und Sequenzierung bestimmt.

LB-Ampicillin/X-Gal/IPTG-Agarplatten: LB-Medium, 15 g/l Agar, 100 mg/l Ampicillin, 25 mg/l X-Gal, 25 mg/l IPTG.

2.2.13 Proteinchemische Arbeitsmethoden

2.2.13.1 Radioimmunpräzipitation

Bei der Radioimmunpräzipitation (RIP) handelt es sich um eine Affinitätsaufreinigung von spezifischem Antigen mit affinem Immunglobulin G (IgG) und anschließender Präzipitation als Antigen-Antikörper-Protein-A-Komplex durch Bindung von Protein A des Bakteriums *Staphylococcus Aureus* an die Fc-Region (kristallisierbares Fragment) der Immunglobuline.

RIP-Grundpuffer: 20 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mg/ml BSA, pH 7,6.

1% Triton (alt) Puffer: 1 % Triton X-100, 0,1 % Desoxycholat, 0,1 % SDS in RIP-Grundpuffer.

1 % Triton (neu) Puffer: 1 % Triton X-100, 0,5 % Desoxycholat, 0,1 % SDS in RIP-Grundpuffer.

0,2 % Triton Puffer: 0,2 % Triton X-100 in RIP-Grundpuffer.

25 % Sucroselösung: 25 % Sucrose, 1 % Triton X-100, 0,5 % Desoxycholat, 0,1 % SDS in RIP-Grundpuffer.

Die tiefgefrorenen Zellen wurden in 500 µl 1 % Triton (alt) Puffer mit 2 % SDS versetzt, 10 min bei 95°C inkubiert und 20 s im Ultraschallbad lysiert. Das Lysat wurde 5 min bei 500 Upm abzentrifugiert (5415 C Eppendorf), anschließend wurden nicht gelöste Zellbestandteile durch Zentrifugation bei 45000 Upm (TLA 45 Rotor, TL100-Zentrifuge Beckmann) für 60 min abgetrennt. Der radioaktive Gehalt eines Aliquots des Überstands (5µl) wurde nach Zugabe von 2 ml Szintillationsflüssigkeit im Szintillationszähler bestimmt. Der Überstand wurde mit 1 x Triton (alt)-Puffer so verdünnt, dass ein Präzipitationsansatz 10^6 cpm enthält. Dieser wurde mit dem für das spezifische Antigen affine Immunglobulin G (IgG) versetzt (3 µl je verwendetem Serum) und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe einer 3 x mit 1 % Triton (alt)-Puffer gewaschenen Protein-A-Suspension (60 µl je Ansatz) wurde über Nacht bei 4°C inkubiert (Kessler, 1981). Um unspezifisches Material vom Antigen-Antikörper-Protein-A-Komplex zu trennen, folgte eine Reihe von Waschschritten. Die Präzipitatsuspension wurde zuerst mit 500 µl 25 % Sucroselösung unterschichtet und bei 5000 Upm (5415 C Eppendorf) für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml 1 % Triton (neu)-Puffer resuspendiert und 5 min bei 5000 Upm (5415 C Eppendorf) zentrifugiert. Dem letzten Waschschriff in 0,2 % Triton-Puffer folgte die Resuspension des Pellets in 10 µl 0,2 % Triton- Puffer (1 : 4,5 in H₂O verdünnt). Die Suspensionen wurden mit 40 µl Probenpuffer für 3 min auf 95°C erhitzt und anschließend bei 10000 Upm für 10 min zentrifugiert (5415 C Eppendorf). Ein Aliquot (5 µl) wurde wie oben beschrieben im Szintillationszähler bestimmt.

Aufgrund dieser Messung wurden angegliche Probenmengen durch SDS PAGE aufgetrennt.

Probenpuffer: 6 M Urea, 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 20 % β -Mercaptoethanol, 10 % Glycerin, 2 % SDS, 0,01 % Bromphenolblau, 0,01 % Phenolrot.

2.2.13.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die diskontinuierliche SDS PAGE wurden in der Regel 10-12 % Jagow-Trenngele mit 4%igen Jagow-Sammelgelen (Schägger und Jagow, 1987) verwendet. Die Elektrophorese der Proteine erfolgte über Nacht bei 47 - 59 V. Zum Gießen der Proteingele wurden Glasplatten (18 cm x 16 cm), 15er Kamm (SE 511-15-1,5, Hoefer) und die Gießvorrichtung (SE 6015, Hoefer) verwendet. Der Gellauf erfolgte in einer Vertikalapparatur mit oberer Kathodenkammer (SE 6054, Hoefer) mit 600 ml Kathodenpuffer und unterer Anodenkammer (SE 6056, Hoefer) mit 1400 ml Anodenpuffer. Die Gele wurden entweder für die fluorographische Auswertung oder für den Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran weiterbehandelt.

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

Gelpuffer: 3 M Tris-HCl pH 8,45, 0,3 % SDS (Verdünnung im Trenngel im Verhältnis 1:3, im Sammelgel 1:4).

Zur Polymerisierung: Ammoniumperoxodisulfat 10 % in H₂O (Trenngel: 175 μ l, Sammelgel 116 μ l), TEMED (Trenngel 17, Sammelgel 12 μ l).

10 x Kathodenpuffer: 100 mM Tris, 0,1 M Tricin, 0,1 % SDS, pH 8,45.

10 x Anodenpuffer: 200 mM Tris-HCl, pH 8,9.

2.2.13.3 Gelbehandlung und Fluorografie

Auf die Gelelektrophorese folgte die einstündige Behandlung des Gels in Fixierlösung und die 2,5-stündige in Gel-Lösung. Das bei 65 °C über 2,5 h getrocknete Gel wurde bei Raumtemperatur auf einen Autoradiographiefilm (X-OMAT AR, Kodak) exponiert.

Fixierlösung: 30 % Methanol (v/v), 10 % Essigsäure (v/v), in H₂O.

Gel-Lösung: 3 % Glycerin (v/v), 20 % Methanol (v/v), in H₂O.

2.2.13.4 Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran („Western Blot“)

Die in der SDS PAGE aufgetrennten Proteine wurden im Elektrotransfer auf eine Nitrozellulosemembran (ProtranBA83, Schleicher & Schuell) übertragen (Towbin et al., 1979; Burnette 1981). Das Gel wurde zuerst 30 min in Transferpuffer („semidry-Buffer“) äquilibriert. Für den „Western Transfer“ wurden pro Gel eine Nitrocellulosemembran und 6 Filterpapiere („Blotting“-Papier MN827B, Macherey-Nagel) zurechtgeschnitten. Der Blot-Aufbau erfolgte in der Reihenfolge 3 Filterpapiere, Nitrozellulosemembran, Acrylamidgel, 3 Filterpapiere. Der Transfer erfolgte über 2 h bei 100 mA und Raumtemperatur in einer „semidry-blot“ Apparatur (TE80; Hoefer).

10 x „semidry-Puffer“: 480 mM Tris pH 8,6, 390 mM Glycine, 0,05 % SDS.

Zur Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran wurde diese 1 h bei Raumtemperatur in Blockierungspuffer (0,5 % (w/v) in PBS/0,05 % Tween 20) geschwenkt. Anschließend wurde die Membran einmal mit PBS/0,05 % Tween 20 gewaschen und mit den jeweiligen spezifischen Primärantikörper zwei Stunden bzw. über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit PBS/0,05 % Tween 20 wurde mit dem sekundären Peroxidase-gekoppelten α -Maus- bzw. α -Kaninchen-Antikörper bei Raumtemperatur für 2 h inkubiert. Es folgten 3 weitere Waschschrte mit PBS/0,05 % Tween 20. Darauf wurden die Proteinbanden durch die Umsetzung eines Substrats (Supersignal Pierce) durch die Peroxidase detektiert. Bei dieser empfindlichen Form der Detektion bedient man sich der Lumineszenz (Biolumineszenz), d.h. eine enzymkatalysierte chemische Reaktion führt zu angeregten Molekülen, die Photonen (Wellenlänge 425 nm) im sichtbaren Spektralbereich abstrahlen. Die Photonen belichten einen auf die Membran gelegten Röntgenfilm (Kodak).

2.2.14 Analyseprogramme

DNA-Sequenzanalysen und -vergleiche wurden mit dem UWGCG-Programm der „Genetics Computer Group“ Version 10.0 durchgeführt (Devereux et al., 1984).

Die Vergleiche der unterschiedlichen Protease-Aminosäuresequenzen wurden mit der „Lasergene“ Software („Megalign“) von dann-STAR durchgeführt.

Für die Auswertung der Spalteffizienzen von LC3-NS3 am „phospho imager“ wurde das Programm Tina 2.0 verwendet.

2.2.15 Expressionsplasmide

2.2.15.1 Herstellung der Konstrukte pSK-LC3 und pSK-LC3

Ausgehend von den Matrizen pEX7/JaCP und pEX-c Δ 18 wurden unter Verwendung der Primer Ol-pskpep6 und Ol-pskrevns3 (Tab. 4) mit Pfu-Polymerase (Stratagene) bei einer Anlagerungstemperatur von 55 °C und einer Verlängerungszeit von 105 s zwei ca. 630 bp große PCR-Produkte amplifiziert. Nach Aufreinigung wurden diese mit den Restriktionsendonukleasen Xho I/Hind III (NEB) verdaut und zusammen mit einem gleich verdauten pSK II-Vektor (Stratagene) ligiert. Die mit Hind III linearisierten Konstrukte wurden für die *in vitro*-Transkription ohne 7-Methylguaninium-Kappe verwendet.

2.2.15.2 Herstellung der Konstrukte pLexAII, pLex-B/LC3 und pLex-B/LC3 Δ

Für die Konstruktion der Plasmide wurden cDNA-Fragmente durch PCR mit den Oligonukleotiden Ol-LexA und Ol-LexARev (Tab. 5) bei einer Anlagerungstemperatur von 53 °C und einer Verlängerungszeit von 140 s durch Pfu-Polymerase amplifiziert. Als Matrize dienten pEX7, pEX7/JaCP und pEX-c Δ 18. Die ca. 780 und 1100 bp großen Amplikons wurden EcoRI und Xho I verdaut und in einen analog geschnittenen pLexA-Vektor ligiert. Die Konstrukte wurden zur Expression in Hefe verwendet.

2.2.15.3 Herstellung der Konstrukte pSin-LC3 und pSin-LC3 Δ

Die Konstrukte pLex-B/LC3 und pLex-B/LC3 Δ wurden durch die Restriktionsendonukleasen BamHI und EcoRI verdaut. Die linearisierten Konstrukte wurden mit Klenow-Fragment behandelt und anschließend religiert. Diese pLexA-Konstrukte wurden Hind III/Xho I geschnitten. Die aus einem Agarosegel extrahierten ca. 1310 bp großen cDNA-Fragmente wurden zusammen mit einem Hind III/Xho I geschnittenen pYES2-Vektor ligiert. Diese

pYES2-Konstrukte wurden Hind III verdaut, anschließend mit Klenow-Fragment behandelt und Sph I geschnitten. Die durch Agrosegeltrennung extrahierten cDNA-Fragmente (ca. 1350 bp) wurden in einen Xba I inkubierten, danach mit Klenow-Fragment und anschließend Sph I behandelten pSinRep5-Vektor ligiert. Die mit Xho I linearisierten Konstrukte wurden für die *in vitro*-Transkription mit 7-Methylguanolinium-Kappe verwendet.

2.2.15.4 Herstellung der Konstrukte pEX- AS¹_Px²

Durch PCR mit pEX7/JaCP als Matrize wurden eine Reihe von cDNAs amplifiziert, die im Bereich der von ihnen kodierten LC3/NS3-Spaltstelle für einen Aminosäure(AS¹)-austausch an der jeweiligen Position (Px²) kodieren. Dabei wurde der Vorwärtsprimer Ol-aΔ0 (Tab. 1) jeweils in Kombination mit einem Rückwärtsprimer (Tab. 2) verwendet. Die Amplifikation der ca. 350 bp großen cDNA-Fragmente erfolgte mit Pfu-Polymerase bei einer Anlagerungstemperatur von 53 °C und einer Verlängerungszeit von 60 s. Diese cDNA-Fragmente wurden mit den Restriktionsendonukleasen Bam HI und Pst I behandelt. In einer zweiten PCR mit pEX7/JaCP als Matrize wurde bei einer Anlagerungstemperatur von 53 °C und einer Verlängerungszeit von 60 s mit den Oligonukleotiden Ol-PSTSI (gggggaggcctgcagtgtgaagaag) und B30RII (ccctgttcacgtgttatcttctgacat) ein ca. 650 bp großes cDNA-Fragment amplifiziert, das Pst I/Hpa I verdaut wurde. Das nach Auftrennung durch ein Agarosegel extrahierte ca. 280 bp große cDNA-Fragment wurde jeweils zusammen mit einem cDNA-Fragment der 1.PCR in einer Tripelligation mit einem Bam HI / Hpa I geschnittenen pEX7/JaCP-Plasmid verknüpft. Die Konstrukte wurden für die transiente Expression im „Vaccinia Virus-T7-System“ verwendet.

2.2.15.5 Herstellung der Konstrukte pEX-a/cΔx

Mit dem Vorwärtsprimer Ol-aΔ0 und je einem der Rückwärtsprimer Ol-cΔ5 und Ol-cΔ18 (Tab. 1) wurden durch PCR mit pEX7/JaCP als Matrize mit Pfu-Polymerase bei einer Anlagerungstemperatur von 53 °C und einer Verlängerungszeit von 60 s zwei ca. 270 -310 bp große cDNA-Fragmente amplifiziert. Diese cDNA-Fragmente wurden Apa I und Bam HI geschnitten. In einer 2. PCR wurde bei einer Anlagerungstemperatur von 53 °C und einer Verlängerungszeit von 60 s mit den Oligonukleotiden Ol-X (gggggatccgacttttgaggggcccgcctg) und Ol-30RII ein ca. 650 bp großes cDNA-Fragment amplifiziert. Dieses wurde Apa I/Hpa I verdaut, und ein daraus resultierendes ca. 280 bp großes cDNA-Fragment wurde zusammen mit dem cDNA-Fragment der 1. PCR in einer Tripelligation mit einem Bam HI/Hpa I behandelten pEX7/JaCP-Plasmid verknüpft. Die Konstrukte kodieren u.a. für carboxyterminal (c) unterschiedlich verkürzte LC3-Insertionen.

Durch identische Vorgehensweise mit dem Rückwärtsprimer Ol-cΔ0 und je einem der Vorwärtsprimer Ol-aΔ9, Ol-aΔ23, Ol-aΔ30 und Ol-aΔ40 (Tab. 1) konnte eine Reihe von Konstrukten hergestellt werden, die u.a. für aminoterminal (a) verkürzte LC3s kodieren. Die Konstrukte wurden alle für die transiente Expression im „Vaccinia Virus-T7-System“ benutzt.

2.2.15.6 Das bAut2B1-Konstrukt

Durch RT-PCR (reverse Transkription: 59 °C, 30 min) mit ca. 2 µg boviner Gesamtzell-RNA als Matrize wurde mit den Primern Ol-Prot1jf und Ol-Prot-jf (Tab. 6) mit einer Anlagerungstemperatur von 65 °C, die in den ersten 9 Zyklen um jeweils 1 °C gesenkt wurde, und einer Verlängerungszeit von 60 s, gefolgt von 40 Zyklen mit einer Anlagerungstemperatur von 57 °C und einer Verlängerungszeit von 60 s, ein ca. 540 bp großes cDNA-Fragment erhalten. Dieses cDNA-Fragment wurde Eco RI / Bam HI behandelt und zusammen mit einem analog geschnittenen pSKII-Vektor ligiert. Die 2. RT-PCR (reverse Transkription: 40 °C, 30 min) mit derselben Matrize und den Primern Ol-RNABI und Ol-JF+1 (Tab. 6) wurde mit einer Anlagerungstemperatur von 64 °C begonnen, die in den ersten 9 Zyklen um jeweils 1 °C gesenkt wurde, und einer Verlängerungszeit von 60 s.

Danach wurden 40 Zyklen mit einer Anlagerungstemperatur von 54 °C und einer Verlängerungszeit von 60 s durchgeführt. Die 2. RT-PCR ergab in der Agarose-Gelelektrophorese keine sichtbare Bande. Deshalb wurde eine PCR mit einem Aliquot der 2. RT-PCR als Matrize und den Primern Ol-JF+2 und Ol-RNABII (Tab. 6) bei einer Anlagerungstemperatur von 53 °C und einer Verlängerungszeit von 45 s durchgeführt; es resultierte ein ca. 570 bp großes cDNA-Fragment. Durch eine zur 1. RT-PCR analogen (45 statt 40 Zyklen) 3. RT-PCR (reverse Transkription: 57°C, 30 min) mit den Primern Ol-ProI und Ol-JFREVI (Tab. 6) wurde ein ca. 490 bp großes cDNA-Fragment amplifiziert.

Durch eine RT-PCR (reverse Transkription: 57 °C, 30 min) mit ca. 2 µg boviner Gesamtzell-RNA wurde mit den Primern Ol-Uff und Ol-war bei einer Anlagerungstemperatur von 53 °C und einer Verlängerungszeit von 70 sec mit 30 Zyklen ein ca. 1250 bp großes cDNA-Fragment amplifiziert. Das Produkt dieser RT-PCR wurde als Matrize in einer PCR mit der Primerkombination Ol-AD1/Ol-REVN1PB (Tab. 6) und Pfu-Polymerase bei einer Anlagerungstemperatur von 55 °C und einer Verlängerungszeit von 3 min verwendet.

2.2.15.7 Das bAut2B2-Konstrukt

Die cDNA des Protease-bAut2.2a-Gens wurde durch RT-PCR (reverse Transkription: 53 °C, 30 min) mit 2 µg boviner Gesamtzell-RNA als Matrize und mit den Primern Ol-Uff und Ol-NDAlI (Tab. 7) bei einer Anlagerungstemperatur von 53 °C und einer Verlängerungszeit von 70 s über 30 Zyklen amplifiziert. In einem weiteren Schritt wurde mit $1/50$ des RT-PCR Ansatzes als Matrize mit den Primern Ol-M1PB und Ol-NDAlI durch PCR mit Pfu-Polymerase bei einer Anlagerungstemperatur von 53 °C und einer Verlängerungszeit von 70 s ein ca. 1400 bp großes cDNA-Fragment amplifiziert. Dieses Amplikon wurde mit Hind II und Xho I behandelt und in einen identisch geschnittenen pYES2-Vektor ligiert. Das Konstrukt wurde für Expression in Hefe und für die *in vitro*-Transkription ohne 7-Methylguanolinium-Kappe verwendet.

2.2.15.8 Das cAut2B-Konstrukt

Dieses Konstrukt wurde in analoger Weise wie bAut2B2 hergestellt, allerdings mit einem Zwischenklonierungsschritt, da die cAut2B kodierende Sequenz eine interne Hind III-Restriktionsendonukleaseschnittstelle besitzt. Zuerst wurde ein pYES2-Konstrukt hergestellt, das die 3'-Region der cAut2B kodierenden Sequenz enthält. Dieses Konstrukt wurde Hind III behandelt, dephosphoryliert und zusammen mit dem 5'-Anteil der cAut2B kodierenden Region ligiert. Das Konstrukt wurde auf zu bAut2B2 identische Weise verwendet.

2.2.15.9 Das bAut2A-Konstrukt

Durch RT-PCR (reverse Transkription: 50 °C, 30 min) mit ca. 2 µg boviner Gesamtzell-RNA als Matrize und den Oligonukleotiden Ol-Aut1 und Ol-AutREVIII (Tab. 8) wurde bei einer Anlagerungstemperatur von 53 °C und einer Verlängerungszeit von 90 s mit 30 Zyklen durchgeführt. Anschließend wurde durch PCR mit 1 µl dieser RT-PCR als Matrize mit den Primern Ol-M2PB und Ol-REVN2PB (Tab. 8) und Pfu-Polymerase bei einer Anlagerungstemperatur von 55 °C und einer Verlängerungszeit von 90 s ein ca. 1600 bp großes cDNA-Fragment amplifiziert. Dieses wurde mit Hind III und Xho I geschnitten und in einen identisch behandelten pYES2-Vektor ligiert. Das Konstrukt diente zur Expression in Hefe und für die *in vitro*-Transkription ohne 7-Methylguanolinium-Kappe.

2.2.15.10 Herstellung des pSK-cLC3-Konstrukts

Durch eine erste PCR mit den Olikonukleotiden OI-TAAS4 und OI-TAASEU (Tab. 3), wobei der Exzisionsklon 16/5 als Matrize diente, wurde bei einer Anlagerungstemperatur von 52 °C und einer Verlängerungszeit von 120 s ein ca. 370 bp großes cDNA-Fragment amplifiziert. Das PCR-Fragment wurde Hind III geschnitten, mit Klenow-Fragment behandelt und anschließend Xho I verdaut. In einer weiteren PCR wurde mit pEX7/JaCP als Matrize und den Oligonukleotiden OI-Alpha6S und OI-Alpha6AS (Tab. 3) bei einer Anlagerungstemperatur von 52 °C und einer Verlängerungszeit von 45 s ein ca. 50 bp großes cDNA-Fragment amplifiziert, das für ein kurzes NS2-Fragment mit der AS-Sequenz M V G N L G E E I G D L E H L G W L E kodiert, welches, als tag verwendet, von dem polyklonalen Antikörperserum α -pep6 detektiert werden kann. Dieses cDNA-Fragment wurde Nco I/Xho I verdaut. Beide Fragmente wurden in einen Not I, danach mit Klenow-Fragment und anschließend Nco I behandelten pCITE2b ligiert. Das resultierende Konstrukt pCITE-Eu2/7 wurde Xho I verdaut, dephosphoryliert und anschließend zusammen mit den kinasierten Oligonukleotiden OI-FRICKE01 und OI-FRICKE02, welche für einen VP5-tag kodieren, ligiert. Das hieraus resultierende Konstrukt pCITE-EuVP9 wurde Xho I geschnitten, dephosphoryliert und zusammen mit dem aus Klon pCITE-Eu2/7 entnommenen LC3-Fragment ligiert. Das entstandene Konstrukt pCITE-EU9/1(7) wurde Nco I/Pst I behandelt. Das dabei entstandene ca. 550 bp große cDNA-Fragment wurde mit Klenow-Fragment behandelt und in einen Xho I/Hind III geschnittenen und durch Klenow-Fragment aufgefüllten pSK II-Vektor ligiert.

Das entstandene Konstrukt pSK-cLC3 wurde für die *in vitro*-Transkription ohne 7-Methylguanolinium-Kappe verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zu viralen RNA-Rekombinationen

3.1.1 Genomanalyse autonom replikationsfähiger zytopathogener Viren

Aus dem Serum eines an „mucosal disease“ verendeten Tiers namens Jasper wurde bereits vor einiger Zeit ein Viruspaar, bestehend aus einem nzp und zp Virus (JaNCP und JaCP), durch biologische Klonierung isoliert und analysiert (Meyers et al., 1998). Das Genom von JaCP weist als zp spezifische Veränderung eine zelluläre Insertion auf, die für einen Teil des LC3-Proteins kodiert. Zudem sind Duplikationen viraler Sequenzen vorhanden, die die zelluläre Insertion flankieren. Untersuchungen an Material, das vor der Analyse nicht biologisch kloniert worden war, hatten Hinweise auf die Anwesenheit weiterer rekombinanter viraler RNA im Tier ergeben. Ziel des ersten Teils der vorliegenden Arbeit war es deshalb, zu untersuchen, ob tatsächlich mehr als ein zp Virus im Tier vorhanden war. Durch Plaquereinigung sollten verschiedene zytopathogene BVD-Viren isoliert und nach Vermehrung in MDBK-Zellen auf Genomebene analysiert werden. Um in der Lage zu sein, sowohl defekte zp Viren als auch autonom replizierende BVDV zu isolieren, wurden die gewonnenen Viren sowohl in normalen MDBK-Zellen als auch in Zellen vermehrt, die vorher mit nzp Viren infiziert worden waren, die als Helfervirus fungieren konnten. Tatsächlich lösten zwei Isolate, C6 und C8, einzig unter Verwendung eines Helfervirus einen zytopathogenen Effekt aus. Die anderen Isolate zeigten den zytopathogenen Effekt auch in Abwesenheit eines Helfervirus. Der erste Schritt der Genomanalyse bestand aus einer Reihe von „Northern Blots“, um Abweichungen in der Genomgröße der verschiedenen Viren zu detektieren und Hinweise auf die Anzahl der in den einzelnen Isolaten enthaltenen viralen Genome zu erhalten. Die Untersuchung zeigte die bei zp Viren oft beobachteten Variationen der Genomgröße, die von der Normalgröße (JaNCP) von 12,5 kb nach unten und oben abweichen und damit Hinweise auf Insertionen, Duplikationen oder Deletionen in den viralen Genomen (Tab. 10). Zusätzlich konnte für alle Klone der unterschiedlichen Isolate die schon von JaCP bekannte zelluläre Sequenz LC3 durch Hybridisierung mit einer LC3 spezifischen Sonde nachgewiesen werden. Damit schienen die Genome aller aus Jasper isolierten zp Viren die gleiche zelluläre Sequenz inseriert zu haben. Genauere Aufschlüsse über die Genomstrukturen ergaben sich aus der Sequenzanalyse.

TABELLE 10

Charakteristika der cDNA-Fragmente, die von unterschiedlichen zp Isolaten aus dem Tier Jasper durch RT-PCR amplifiziert wurden

Isolat	Northern	RT-PCR	
		Ol-B32II/ Ol-JasIns1	Ol-BVDV32/ Ol-JasIns1
C1	a, c (b)	+ C1.2 ca. 500 bp	+ C1.1 ca. 580 bp
C2	b, c	+ C2.2 ca. 650 bp	+ C2.1 ca. 630 bp
C6	a, c	n.d.	+ C6.1 ca. 400 bp C6.2 ca. 300 bp C6.3 ca. 250 bp
C8	a, c	-	+ C8.1 ca. 450 bp C8.2 ca. 550 bp C8.3 ca. 1300 bp
A1	b	+ ca. 650 bp	-
A2	b	+ ca. 500 bp	-
A3	b	+ ca. 550 bp	-
A4	b	+ ca. 800 bp	-
A5	a, b	+ ca. 2800 bp + ca. 650 bp	-
A7	b (c)	+ ca. 820 bp	-
B8	b (c)	+ ca. 650 bp	+ B8.1 ca. 250 bp
D4	b (c)	+ ca. 950 bp	-
D7	b (c)	+ D7.2 ca. 720 bp	+ D7.1 ca. 250 bp

Tab. 10: Charakteristika von cDNA Fragmenten isoliert nach RT-PCR ausgehend von RNA verschiedener Virus-Isolate von Jasper. Die zweite Spalte fasst die Resultate der „Northern blot“-Analyse zusammen: a, Detektion einer Bande von ca. 12,5 kb; b, einer Bande von, deutlich mehr als 12,5 kb; und c, einer Bande, die deutlich unterhalb von 12,5 kb liegt. Banden deren Größe aufgrund von Verschmierung oder zu geringer Intensität nicht klar detektierbar waren, wurden entweder mit (b) oder (c) bezeichnet. Die beiden rechten Spalten fassen die Resultate der RT-PCR zusammen. Die An- bzw. Abwesenheit von spezifischen Banden wurde mit + bzw. - bezeichnet. Die Größe der mit den oben angegebenen Oligonukleotidkombination amplifizierten Fragmente in Basenpaaren (bp) wurde zusammen mit der Bezeichnung aufgeführt.

Um nicht von allen Isolaten die gesamte cDNA-Sequenz ermitteln zu müssen, wurden RT-PCR Analysen mit drei Primerkombinationen durchgeführt. Die Primersequenzen waren so gewählt, dass die die LC3-Insertion flankierenden Sequenzen amplifiziert werden konnten. Das erste Primerpaar bestand aus dem LC3 spezifischen Ol-JasIns2 mit positiver Polarität und dem Ol-B22.1R, das komplementär zum NS3-Gen zwischen Position 5183 und 5203 ist. Diese Kombination wurde gewählt, da bei allen bekannten zp BVD-Viren mit zellulärer Insertion NS3 kodierende Sequenzen direkt oder wenig stromab der zellulären Sequenz folgen. Das Ol-JasIns1 bindet ebenfalls in der LC3 kodierenden Sequenz, allerdings besitzt es nichtkodierende Orientierung. Aufgrund der zu erwartenden variablen Übergangsbereiche stromab der zellulären Insertion wurde Ol-JasIns1 mit den Primern Ol-BVD32 oder Ol-B32II (Position 363-388 oder 6976-6996) kombiniert. Durch die Kombination mit Ol-BVD32/JasIns1 sollten nur Sequenzen defekter Genome mit großen Deletionen amplifiziert werden, während Ol-B32II verwendet wurde, um virale NS3-Duplikationen, die sich nach bisherigem Kenntnisstand immer bis über das 3'Ende des NS3 Gens erstrecken, zu amplifizieren.

Für alle Klone wurde mit der Primerkombination Ol-JasIns2/Ol-B22.1R ein identisches, ca. 300 bp großes DNA-Fragment amplifiziert. Die Sequenzierung dieses Fragments zeigte, dass der Übergang von der LC3 kodierenden Sequenz zum abwärts gelegenen NS3-Gen immer konserviert war. Die Isolate C6 und C8 wiesen nach der RT-PCR mit den Primern Ol-BVD32 und Ol-JasIns1, der Primerkombination zur Ermittlung von Genomdeletionen, jeweils ein Muster von drei unterschiedlich großen Banden (400, 300, 250 bp bzw. 450, 550, 1300 bp) auf. Jede der Banden ist wahrscheinlich von einem separaten defekten Virus mit Deletion im Bereich der Strukturgene abgeleitet; sie wurden JaC6.1, JaC6.2 und JaC6.3 bzw. JaC8.1, JaC8.2 und JaC8.3 genannt (Tab. 10). Die Isolate B8, C1, C2 und D7 zeigten mit der selben Primerkombination jeweils ein Amplikon, das JaB8.1 (250 bp), JaC1.1 (500 bp), JaC2.1 (650 bp) bzw. JaD7.1 (250 bp) genannt wurde. Daneben wurden mit der Primerkombination Ol-B32II/Ol-JasIns1 Amplikons ermittelt, die virale Duplikationen enthalten; sie bekamen die Bezeichnung JaB8.2 (650 bp), JaC1.2 (580 bp), JaC2.2 (630 bp) und JaD7.2 (720 bp). Diese Isolate repräsentieren damit höchstwahrscheinlich eine Mischung aus defekten und nichtdefekten Viren mit unterschiedlicher Genomstruktur (Tab. 10). Von den restlichen Isolaten A1 (650 bp), A2 (500 bp), A3 (550 bp), A4 (800 bp), A5 (2800 und 650 bp) und D4 (950 bp) konnten mit der Primerkombination Ol-B32II/Ol-JasIns1 cDNA-Fragmente amplifiziert werden, die auf virale Duplikationen hindeuten und damit von nichtdefekten Viren stammen sollten (Tab.10).

Für alle Isolate konnte also durch RT-PCR eine Variation verschieden großer Amplikons, ausgehend von der LC3 kodierenden Sequenz, erhalten werden. Die Amplikons wurden sequenziert, um die einzelnen Genomstrukturen von möglichen nichtdefekten oder defekten Viren rekonstruieren und die Übergangssequenzen der Deletionen und Duplikationen, bestimmen und vergleichen zu können.

Die drei Amplikons des Isolats C6 wurden der Theorie entsprechend von den Viren JaC6.1, JaC6.2 und JaC6.3 abgeleitet, deren Genom eine Deletion enthält. Die Größe der einzelnen Amplikons ist reziprok zur jeweiligen Deletionsgröße. Bei JaC6.2 ist die N^{PRO} kodierende Region nur 42 Nukleotide lang und das NS2-Fragment auf nur ein Kodon reduziert, bei JaC6.1 und JaC6.2 waren die Positionen, an denen die NS2 kodierenden Sequenzen mit der LC3-Insertion fusionieren, exakt dieselben (Abb.2).

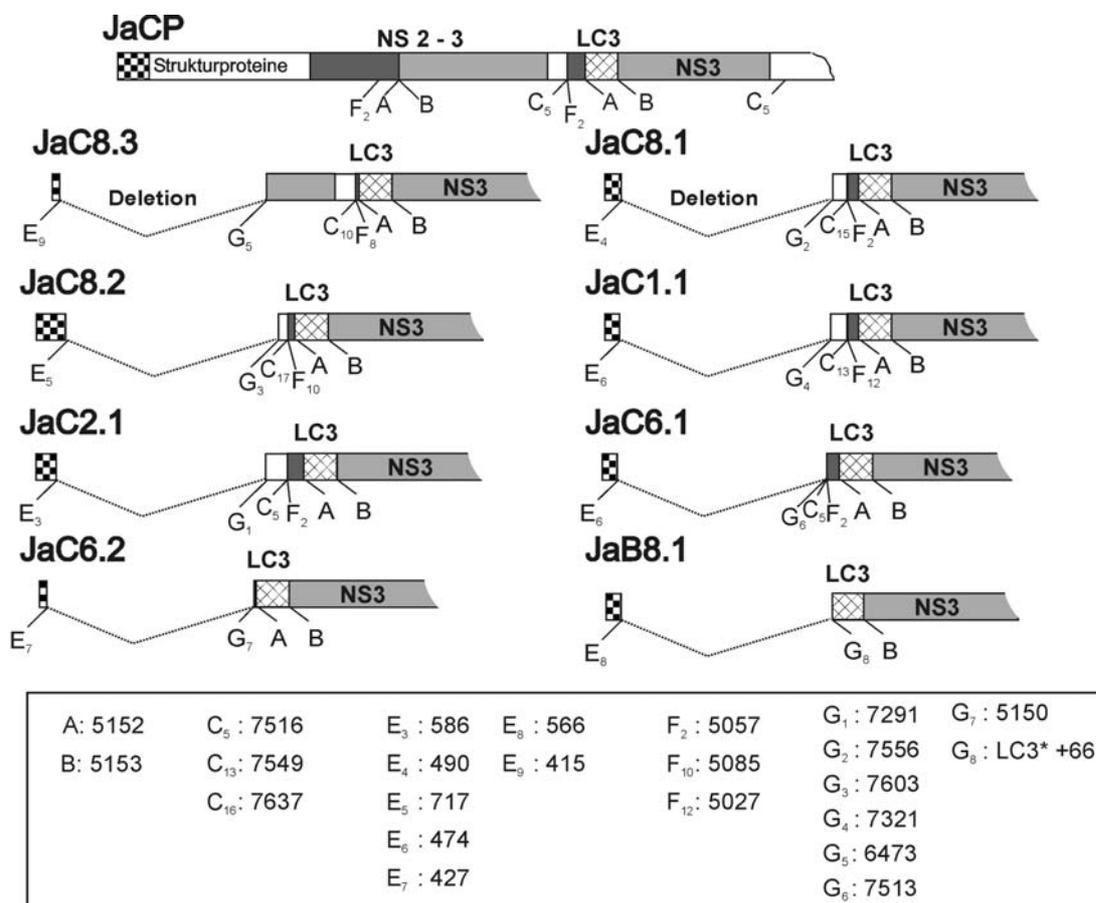
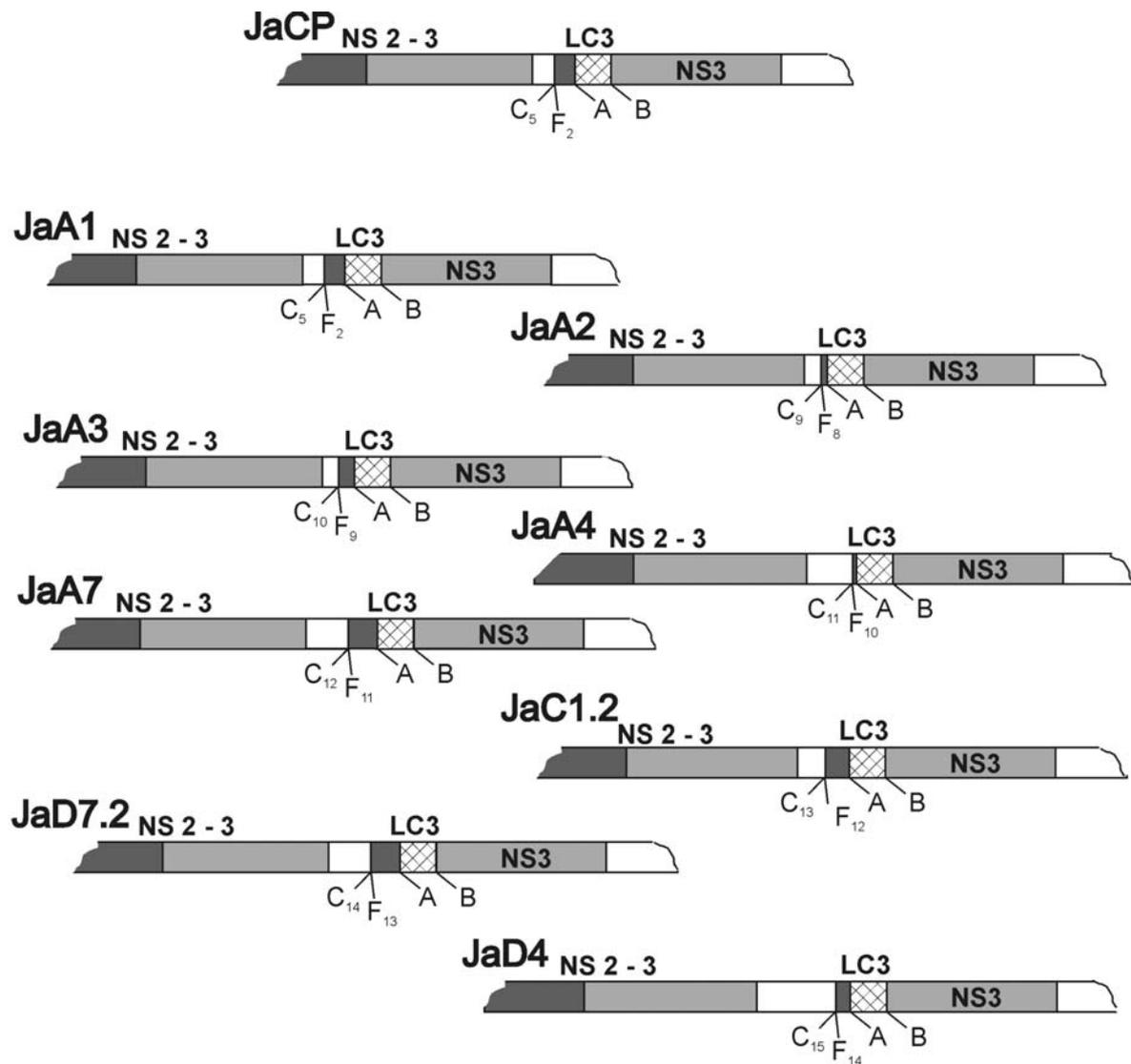


Abb. 2: Rekonstruierte Genomstrukturen von defekten Viren. Nach Sequenzierung der durch RT-PCR erhaltenen cDNA Fragmente, wurde eine Reihe von Genomstrukturen von defekten Viren mit unterschiedlichen Deletionen rekonstruiert. Alle mutmaßlichen Viren, wurden aus dem primären Isolat, das mit Material aus Jasper etabliert wurde, isoliert. Die Positionen der Rekombinationsstellen sind in der Legende aufgelistet. Die Position G₈ bei JaB8.1 markiert den um ein Kodon verkürzten LC3-Anteil.

Die Sequenz von JaC6.3 ist im analysierten Bereich mit denen der Viren JaB8.1 und JaD7.1 identisch, so dass lediglich die Struktur von JaB8.1 in Abb. 2 aufgezeigt wurde. Das Virusgenom, von dem dieses Fragment abgeleitet wurde, zeigt die direkte Fusion eines verkürzten N^{pro}-Gens mit einer um ein Kodon verkürzten LC3-Insertion. Die rekombinierten Genome der Viren JaC8.1, JaC8.2 und JaC8.3 bestehen aus gekürzten N^{pro}-Genen, gefolgt von variablen kurzen NS4 und NS2 kodierenden Fragmenten, und der LC3-Insertion (Abb. 2). Die zwei wahrscheinlich defekten Viren JaC1.1 und JaC2.1 der Isolate C1 und C2 sind ähnlich organisiert (Abb. 2). Die nichtdefekten Viren dieser Isolate zeigen dagegen entweder einen mit der JaCP RNA-Struktur identischen Genomaufbau oder eine nur in Bezug auf die Größe der Duplikation abweichende Genomstruktur (JaC2.2 bzw. JaC1.2) (Abb. 3). Ebenso zählten JaB8.2 und JaA1 zu den Viren, deren Genome im Aufbau mit der JaCP RNA-Struktur identisch sind. Die restlichen autonom replizierenden zp BVDV-Isolate zeigten in den „Northern blot“-Hybridisierungen eine genomische RNA von weit mehr als 12,5 kb, was auch für andere BVD-Viren mit Duplikation und zellulären Insertionen charakteristisch ist (Tab. 10) (Meyers et al., 1991; Meyers et al., 1998). Die Genome der Viren JaA2, JaA3, JaA4, JaA7, JaD4 und JaD7.2 zeigten alle einen der JaCP RNA-Struktur entsprechenden Aufbau; Variation zeigte sich lediglich in der Größe der Duplikation. Die Unterschiede in den Duplikationen beschränken sich auf die Übergangssequenzen zwischen den verkürzten NS4- und NS2-Genen, die 5' der LC3 kodierenden Sequenz lokalisiert sind. Die Größe des duplizierten NS2-Anteils variiert von 24 (JaA2) bis zu 288 (JaA7) Nukleotiden. Die Länge des zusätzlich zum NS3-Gen duplizierten NS4-Anteils variiert zwischen 264 (JaA3 und JaA2) und 660 (JaD4) Nukleotiden (Abb. 3).

Die Ergebnisse der Untersuchung durch „Northern Blot“ mit RNA von Zellen, die mit Isolat A5 infiziert wurden, enthüllte die Präsenz zweier unterschiedlicher viraler RNAs von ca. 12 kb und 17 kb (Tab.10). Ebenfalls konnten durch RT-PCR mit der Primerkombination Ol-JasIns1/Ol-B32II zwei Amplikons für das Isolat A5 detektiert werden, was für die wahrscheinliche Existenz zweier Genome mit grossen Duplikation spricht. Das kleinere Amplikon war von einem Genom abgeleitet, das innerhalb der sequenzierten Region identisch war mit dem von JaCP. Die größere cDNA war von einem Genom mit erheblich größerer Duplikation abgeleitet. Versuche, die beiden mutmaßlichen Viren JaA5.1 und JaA5.2 durch weitere Plaquereinigungen zu separieren, schlugen jedoch fehl. Somit konnte nicht geklärt werden, ob zumindest eines der Viren autonom replikationsfähig ist.



A: 5152	C ₅ : 7516	C ₁₂ : 7582	F ₂ : 5057	F ₁₁ : 4865
B: 5153	C ₉ : 7471	C ₁₃ : 7549	F ₈ : 5129	F ₁₂ : 5027
	C ₁₀ : 7471	C ₁₄ : 7546	F ₉ : 5072	F ₁₃ : 4889
	C ₁₁ : 7637	C ₁₅ : 7867	F ₁₀ : 5085	F ₁₄ : 5072

Abb. 3: Genomstrukturen von mutmaßlichen autonom replizierenden znp Viren mit Duplikationen viraler Sequenz. Die Viren stammen aus dem Primärisolat das aus dem Ochsen Jasper gewonnen wurde. Die Genomstrukturen wurden ausgehend von partiellen Sequenzen, die von RT-PCR Fragmenten ermittelt wurden, rekonstruiert. Alle hier gezeigten Genomstrukturen besitzen zwei Duplikationen viraler Sequenzen. Die Positionen der Rekombinationsstellen beziehen sich auf die Genompositionen des nzp BVDV SD1 (Deng und Brock, 1992).

Ein Indiz für das Vorhandensein zumindest eines defekten Virus' in diesem Isolat ist, dass im „Northern Blot“ nur eine Bande von deutlich mehr als 12,5 kb detektiert wurde.

Als ein wichtiges Ergebnis der Untersuchungen bleibt festzuhalten, dass für jede analysierte rekombinante virale RNA die Positionen, an denen die NS3 und NS2 kodierenden Sequenzen mit der LC3-Insertion fusionieren, exakt übereinstimmten. Damit lassen sich die verschiedenen Genome auf eine einzige Grundstruktur zurückführen, die sich lediglich im Auftreten von unterschiedlichen Deletionen oder Duplikationen variabler Länge stromauf der LC3-Insertion voneinander abgrenzen.

3.1.2 Sequenzanalyse der Rekombinationsstellen

Es gibt Hinweise aus anderen Systemen, dass die Selektion einer Rekombinationsstelle durch Homologie der Rekombinationspartner an der Übergangssequenz unterstützt wird (Bujarski et al., 1984; Agol, 1997; Nagy und Simon, 1993; White und Moris, 1994, 1995; Becher et al., 1999). Deshalb wurden alle viralen Sequenzen der RNA-Rekombinanten aus den Jasper-Isolaten im Bereich der Übergangsstellen im Hinblick auf mögliche Homologien mit dem Genom bzw. der LC3-mRNA verglichen. Um eine virale Vergleichssequenz für diese Untersuchungen zur Verfügung zu haben, wurde aus den ermittelten Sequenzfragmenten eine Konsensussequenz ohne Insertion, Duplikation oder Deletion zusammengestellt in der Annahme, dass diese Sequenz der JaNCP-Sequenz entspricht oder zumindest sehr ähnlich ist. In manchen Fällen war es unmöglich zu entscheiden, ob Sequenzabschnitte im Bereich der Rekombinationsstelle vom 3' oder vom 5' Rekombinationspartner abgeleitet waren. Wie in den Dreifach-Vergleichen zu sehen, umfassen diese Sequenzbereiche 1 bis 7 Nukleotide (Abb. 4). In einigen Fällen war zusätzlich zur Überlappung an der Rekombinationsstelle im Anschluß an eine interpositionierte Folge von nicht homologen Nukleotiden ein zusätzlicher homologer Bereich zu finden, der von der Rekombinationsstelle aus entweder nach 5' oder 3' ausgerichtet war. In anderen Fällen konnte keine Homologie im Übergangsbereich nachgewiesen werden. Interessanterweise ist dies auch der Fall für die Sequenzen, an deren das verkürzte NS2-Gen und die LC3-Sequenz bzw. die LC3-Insertion mit der NS3 kodierenden Sequenz fusioniert sind.

Dieses Kodon entstammt höchstwahrscheinlich der NS4-kodierenden Sequenz. Das defekte Virus JaC6.1 könnte deshalb von einem Virus abgeleitet sein, das eine Duplikation besitzt, die äquivalent zu der des BVDV JaCP ist. Bei JaC8.3 ist von zwei möglichen Rekombinationsstellen die stromaufwärts gelegene Sequenz gezeigt. Die ermittelten Rekombinationsstellen der Klone pJ16, pJ21 und pJ28/2 sind aus Vorarbeiten zu dieser Arbeit entnommen (Fricke et al., 2001).

Die Resultate der Sequenzvergleiche zeigten, dass bei 17 von 25 der analysierten Rekombinationsstellen Homologie der verglichenen Sequenzen bestand, aber in 8 der 17 positiven Fälle der Homologiebereich nur ein einziges Nukleotid umfasste. Daher ist anzunehmen, dass die Basenpaarung zumindest keine zentrale Rolle bei der Auswahl der Rekombinationsposition spielt. Somit scheint zufällige Auswahl der Position, gefolgt von Selektion funktioneller zp Viren, für die Lokalisation der Fusionspunkte verantwortlich zu sein (Kupfermann et al, 1996; Baroth et al., 2000).

3.1.3 Chronologische Erfassung von Rekombinanten aus Jasper

Bisher gibt es wenig detaillierten Aufschluss über die Entwicklung von MD. Entscheidende Aspekte wie etwa der Zeitpunkt, zu dem das zp Virus gebildet wird, und die Zeitspanne, bis die zum baldigen Tod des Tiers führenden Symptome auftreten, sind nicht bekannt. Jasper war im Februar 1987 als persistent infiziertes Tier identifiziert worden und daraufhin unter isolierten Bedingungen eingestallt, bis er im November 1989 aufgrund des Auftretens von MD getötet werden musste (Gunn und Weavers, 1992). Während der gesamten Zeit wurden regelmäßig Serumproben gesammelt und bei -70°C gelagert. In der vorliegenden Arbeit diente dieses Material dazu, den Zeitpunkt des Auftretens von möglichen zp Viren einzugrenzen. RNA wurde direkt aus den Serumproben isoliert und in einer RT-PCR mit dem Primerpaar OI-JasIns 2/OI-B22.1R in cDNA übersetzt und vermehrt. Es folgte dann eine zweite PCR mit der Primerkombination OI-LSIV/OI-Jas-JF. Die Primer wurden so gewählt, dass sie den bei allen oben beschriebenen Rekombinanten konservierten Übergang von der LC3 kodierenden Sequenz zum NS3-Gen amplifizieren können. Als Negativkontrollen dienten Serumproben von Rindern, die nachweislich nicht mit BVDV infiziert waren. Insgesamt wurden für 4 von 8 Serumproben von Jasper ca. 0,35 kb große cDNA Banden identifiziert (Abb. 5). Die Sequenzierung dieser cDNA-Fragmente zeigte für die konservierte Position, an denen die LC3 kodierende Sequenz mit dem NS3-Gen fusioniert waren, exakt die bekannten Sequenzen. Da in insgesamt 16 unabhängigen Kontrollproben, die parallel zu den Jasper-Serenproben aufgearbeitet wurden, niemals Amplikons nachgewiesen werden konnten, ist damit gezeigt, dass rekombinante RNA mit der bekannten Rekombinationsstelle (LC3/NS3) wenigstens 1 Jahr vor dem Ausbruch von MD präsent war.

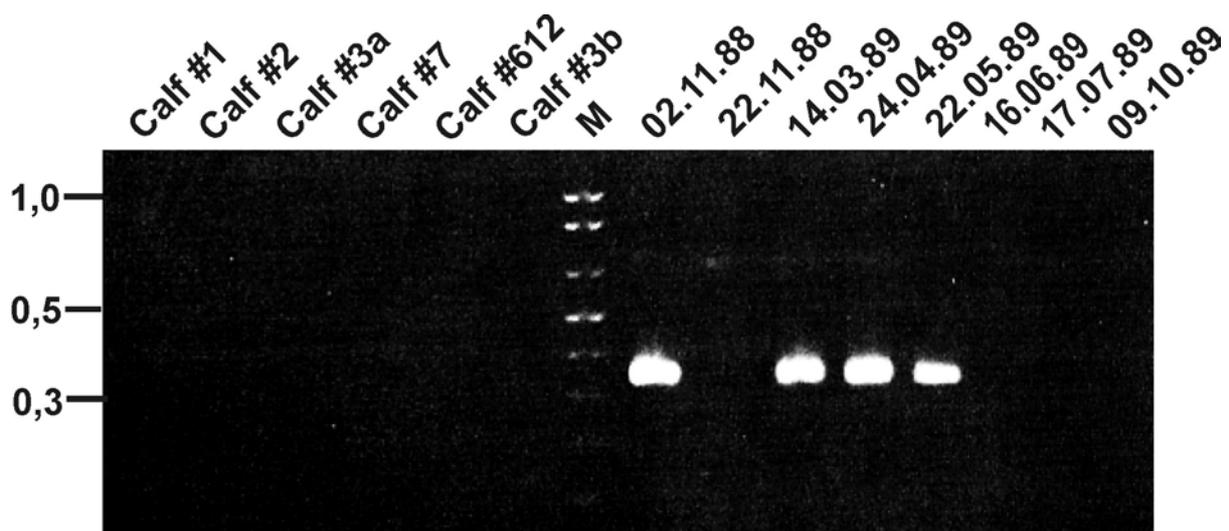


Abb. 5: Analyse von cDNA Fragmenten amplifiziert aus Serumproben, die Jasper vor Ausbruch von MD entnommen wurden. Das Ethidiumbromid gefärbte Agarosegel zeigt rechts des mitgeführten Größenmarkers (M) die Amplifikate, die ausgehend von Serumproben des Tiers Jasper erhalten wurden, in chronologischer Folge der Probennahme. Die Daten der Serumentnahmen sind angegeben. Serumproben von verschiedenen nicht infizierten Kälbern dienten als Kontrolle (1. - 6. Spur).

3.2 Untersuchungen zur LC3 induzierten Proteinspaltung

3.2.1 Einfluss von Proteaseinhibitoren auf die Polyproteinprozessierung

Die RNA Rekombination, die im Verlauf der MD-Entstehung zu zp Viren führt, bewirkt dass das vom veränderten Genom abgelesene Polyprotein am Aminoterminus des NS3 gespalten wird. Im Falle von JaCP ist die LC3-Insertion verantwortlich für diese Spaltung wobei bisher nicht bekannt war, wie LC3 die Spaltung induziert und welches die verantwortliche Protease ist. Die Prozessierung konnte ebenfalls nach *in vitro*-Translation eines Polyproteinfragments in Kaninchen Retikulozytenlysat (RRL) gezeigt werden (Meyers et al., 1998). Diese Tatsache ermöglicht es, auf einfache Weise den Einfluß von Proteaseinhibitoren auf die Prozessierung zu untersuchen und damit Hinweise auf die Natur der verantwortlichen Protease zu erhalten. Es wurden deshalb *in vitro*-Translationen in RRL in Anwesenheit gängiger Proteaseinhibitoren durchgeführt. Das primäre Translationsprodukt der von pSKLC3II abgeleiteten RNA besteht aus den carboxyterminalen 168 Aminosäuren des NS2, der LC3-Insertion und den ersten 96 Aminosäuren von NS3 und hatte ein MW von ca. 42 kD während bei korrekter Prozessierung Spaltprodukte mit 32 kD und 10kD zu erwarten sind. Nach Translation der RNA und Analyse der Produkte durch SDS PAGE und Fluorografie konnte eine Reduktion der Spaltung lediglich durch die Einwirkung von TLCK, einem bekannten Cysteinproteaseinhibitor, gezeigt werden (Abb. 6). Alle anderen getesteten

Proteaseinhibitoren hatten keinen Einfluss auf die Spaltung des exprimierten Polyproteinfragments. Bei Anwesenheit von TLCK beträgt die Reduzierung der Spaltung 67 %. Es kann daher angenommen werden, dass eine Cysteinprotease für die Spaltung des LC3 enthaltenden Polyproteinfragments verantwortlich ist.

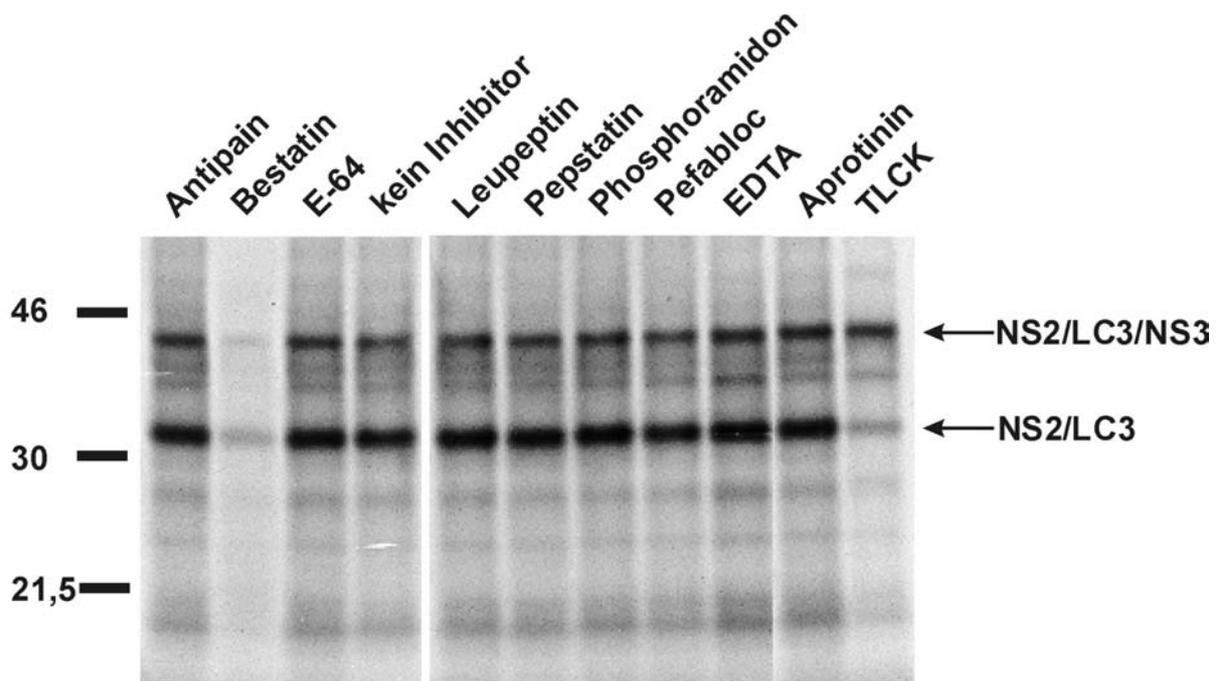


Abb. 6: Einfluss unterschiedlicher Proteaseinhibitoren auf die LC3 induzierte Spaltung des viralen Polyproteins. Die Translation von RNA, abgeleitet vom Konstrukt pSK-LC3 führt zu einem Fusionsprotein bestehend aus den 168 carboxyterminalen Aminosäuren von NS2, der LC3-Insertion und den 96 aminoterminalen Aminosäuren von NS3 (Produkt: NS2/LC3/NS3). LC3 induzierte Prozessierung des primären Translationsprodukts führt zum Spaltstück NS2/LC3 sowie einem auf dem gezeigten Gel nicht detektierbaren NS3-Fragment (10 KD). Die Translation in RRL („rabbit reticulocyte“) wurde in RRL in Gegenwart gängiger Proteaseinhibitoren durchgeführt. Die [³⁵S] markierten Reaktionsansätze wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und fluorographisch ausgewertet. Die Molekulargewichte von Standardproteinen in kD sind am linken Rand der Abbildung angegeben.

3.2.2 Die Klonierung von potentiellen Proteasegenen

Daten aus dem Hefesystem zeigen, dass die zelluläre Cysteinprotease Aut2p/Apg4p das LC3 homologe Protein Aut7p/Apg8p an einem Glycin im C-terminalen Bereich spaltet (Kirisako et al., 2000). Die Spaltung erfolgt an einer Position, die dem Carboxyterminus der LC3-Insertion im viralen Polyprotein entspricht (Meyers et al., 1998). Es ist deshalb naheliegend, dass in höheren eukaryontischen Zellen zumindest eine zelluläre Protease vorhanden ist, die LC3 prozessiert und das virale Polyprotein mit der LC3-Insertion spaltet. Basierend auf Sequenzvergleichsstudien konnten zwei unterschiedliche humane Aut2-homologe Sequenzen, HsApg4A und HsApg4B, identifiziert werden (Kirisako et al., 2000). Um zu testen, ob bovine Zellen (MDBK) HsApg4A und HsApg4B homologe Proteine enthalten und ob eines dieser

Proteine tatsächlich LC3 prozessiert, wurde versucht, dafür kodierende Sequenzen durch RT-PCR zu amplifizieren und anschließend in pYES2 Vektoren zu klonieren.

Die erste homologe Sequenz, bAut2B1, wurde in drei Schritten ermittelt. In einem ersten RT-PCR Schritt wurde ein ca. 0,54 kb großes intragenisches Sequenzfragment mit den durch Sequenzvergleich ermittelten Oligonukleotiden Ol-Prot1jf und Ol-Prot-jf amplifiziert. Die Sequenzierung des erhaltenen Fragments erbrachte die Information für die Generierung spezifischer Primer für die weiteren RT-PCR Ansätze. Zuerst wurde versucht, das 3'-Ende durch eine RT-PCR mit dem Poly-A-Oligonukleotid Ol-RNABI und dem zum ermittelten Sequenzfragment homologen Oligonukleotid Ol-JF+1 zu amplifizieren. Es zeigten sich jedoch keine sichtbaren Amplikons, so dass eine zweite PCR mit den Oligonukleotiden Ol-RNABII und Ol-JF+2 durchgeführt wurde. Damit gelang es, ein ca. 570 bp großes cDNA Fragment zu amplifizieren, das für das 3'-Ende von bAut2B1 kodiert. Das cDNA-Fragment, das für die aminoternale Region von bAut2B1 kodiert, wurde mit der Primerkombination Ol-ProI/Ol-JFREVI durch RT-PCR vermehrt. Nach Sequenzierung aller drei cDNA Fragmente wurde ein Oligonukleotidpaar (Ol-Uff und Ol-war) ausgewählt, das den gesamten kodierenden Bereich von bAut2B1 umfasste, und ein ca. 1250 bp großes cDNA-Fragment durch RT-PCR amplifiziert. Die anschließende PCR mit den Oligonukleotiden Ol-AD1 und Ol-REVN1PB diente der Generierung von Spaltstellen für die Restriktionsendonukleasen EcoRI und XhoI. Das cDNA Fragment konnte über diese Schnittstellen in pYES2 kloniert werden. Dieses Plasmid ist mit einem GAL 1 Promotor für die Expression in Hefe ausgestattet.

Zwei weitere bovine Sequenzen, bAut2A und bAut2B2, konnten durch RT-PCR ermittelt werden (Abb. 7). Die Auswahl der Oligonukleotide für diese RT-PCRs basierte auf einer Reihe von Sequenzvergleichsstudien zwischen mutmaßlichen Aut2 Homologen. Die Sequenz bAut2A wurde zuerst mit der Oligonukleotidkombination Ol-Aut1/Ol-AutREVIII amplifiziert. Anschließend wurden durch PCR mit den Primern Ol-M2PB und Ol-REVN2PB die für die Ligation mit dem pYES2 notwendigen Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen HindIII und XhoI an die Enden der cDNA eingeführt. Die RT-PCR mit den Oligonukleotiden Ol-Uff und Ol-NDAII erlaubte die Amplifikation der Sequenz bAut2B2. Die Generierung der Spaltstellen für die Restriktionsendonukleasen Hind III und XhoI zur Klonierung des cDNA Fragments in pYES2 erfolgte durch PCR mit den Oligonukleotiden Ol-M1PB und Ol-NDAII.

1	M D D F L S R I G V I Y M Q R W L Q L W K M D L V Q K V S H G V F E G S S E E P A A L M N H D Y I V	Aut2p
1	M E S V L S K Y	HsApp4A
1	M E S V L S K Y	bAut2A
1	M D A A T L T Y	HsApp4B
1	M D A A T L T Y	bAut2B1
1	M D A A T L T Y	bAut2B2
1	M D A A T L T Y	cAut2B
51	L G E V Y P E R D E E S G A E Q C E Q D C R Y R G E A V S D G F L S S L F G R E - I S S Y T K E F	Aut2p
20	E E Y P D T D E E	HsApp4A
20	E E Y P D T D E E	bAut2A
17	E D F P E T S E	HsApp4B
17	E D F P E T S E	bAut2B1
17	E D F P E T S E	bAut2B2
16	E D F P E T K E	cAut2B
99	L L D V Q S R V N F T Y R T R F V P I A R A P D G P S P L S L N L L V R T N P I S T I E D Y I A N P	Aut2p
46	L S D I S A R L W F T Y R R K F S P I G	HsApp4A
46	L S D I S A R L W F T Y R R K F S P I G	bAut2A
43	L S D V A S R L W F T Y R K N F P A I G	HsApp4B
43	L A D V A S R L W F T Y R K N F P A I G	bAut2B1
43	L A D V A S R L W F T Y R K N F P A I G	bAut2B2
42	L L D V T S R L W F T Y R K N F P A I G	cAut2B
149	D C F N D I G W G C M I R T G Q S L L G N A L Q I L H L G R D F R V N G N E S L E R E S K F V N	Aut2p
70	S S D A G W G C M L R C G Q M M L A Q A L I C R H L G R D W S W E K Q K E Q P K E Y Q R I L Q	HsApp4A
70	S S D A G W G C M L R C G Q M M L A Q A L I C R H L G R D W N W E K Q K E Q P K E Y Q R I L Q	bAut2A
67	T S D T G W G C M L R C G Q M I F A Q A L V C R H L G R D W R W T Q R K R Q P D S Y F S V L N	HsApp4B
67	T S D T G W G C M L R C G Q M I F A Q A L V C R H L G R D W R W T Q R K R Q P D S Y C S V L Q	bAut2B1
67	T S D T G W G C M L R C G Q M I F A Q A L V C R H L G R D W R W T Q R K R Q P D S Y C S V L Q	bAut2B2
66	T S D T G W G C M L R C G Q M I F A Q A L V C R H L G R D W R W I K G K R Q T D N Y F S V L N	cAut2B
198	W F N D T P E A P F S L H N F V S A G T E L S D K R P G E W F G P A A T A R S I Q S L	Aut2p
117	C F L D R K D C C Y S I H Q M A Q M G V G E G K S I G E W F G P N T V A Q V L K K L A L F D E W N	HsApp4A
117	C F L D R K D C C Y S I H Q M A Q M G V G E G K S I G E W F G P N T V A Q V L K K L A L F D E W N	bAut2A
114	A F I D R K D S Y S I H Q I A Q M G V G E G K S I G Q W Y G P N T V A Q V L K K L A V F D T W S	HsApp4B
114	A F I D R K D S C Y S I H Q I A Q M G V G E G K S I G Q W Y G P N T V A Q V L K K L A V F D T W S	bAut2B1
114	A F I D R K D S C Y S I H Q I A Q M G V G E G K S I G Q W Y G P N T V A Q V L K K L A V F D T W S	bAut2B2
113	A F I D K K D S Y S I H Q I A Q M G V G E G K S I G Q W Y G P N T V A Q V L K K L A T F D T W S	cAut2B
241	S L A V H V F P E C G I D D C I V I S V S S G D I Y E N E V E K V E A	Aut2p
166	S L A V H V F P E C S M D N T V V I E D I K K M C R V L P L S A D T A G D R P P D S L T A	HsApp4A
166	S L A V H V F P E C S M D N T V V I E D I K K M C R T L S L S A D T P A E R P L E S L T A	bAut2A
163	S L A V H I A M D N T V V M E E I R R L C R T S V P C A G A T A F P A D S D R H C N G F F P	HsApp4B
163	A L A V H V A M D N T V V M A D I R R L C R S S L P C A G A E A F P A D S E R H C N G F P	bAut2B1
163	A L A V H V A M D N T V V M A D I R R L C R S S L P C A G A E A F P A D S E R H C N G F P	bAut2B2
162	S L A V H I A M D N T V V M E E I R R L C Q S N F S C A G A A A C P A V E A D V L Y N G Y P	cAut2B
272	E N P N S S R I L F L G V K L G I N A V N E S Y R E S I C G I L S S T Q S V G	Aut2p
207	S N Q S K G T S A Y C T A W K P L L L I V P L R L G L I N Q I N P V Y V D A F K E C F K M P Q S L G	HsApp4A
207	S N Q S K G P S A C C T A W K P L L L I V P L R L G L I N Q I N P V Y V D A F K E C F K M P Q S L G	bAut2A
208	A G A E V T N R P S P W R P L V L L I P L R L G L T D L N E A Y V E T L K H C F M P Q S L G	HsApp4B
208	A G A E G G R A A P W R P L V L L I P L R L G L A D V N A Y A G T L K H C F R M P Q S L G	bAut2B1
208	P A A E G G R A A P W R P L V L L I P L R L G L A D V N A Y A G T L K H C F R M P Q S L G	bAut2B2
208	E E A G V R D K L S L W K P L V L L I P L R L G L T E I N E A Y I E T L K H C F M M P Q S L G	cAut2B
311	I A G G R P S S S L Y F F G Y Q G N E F L H F D P H I P Q P A V E D S F V E S C H T S K F G K L Q L	Aut2p
256	A L G G K P N N A Y Y F I G F L G D E L I F L D P H T T Q T F V D T E E N G T V N D D Q T F	HsApp4A
256	A L G G K P N N A Y Y F I G F L G D E L I F L D P H T T Q T F V D T E E N G T A D D Q T F	bAut2A
255	V I G G K P N S A H Y F I G Y V G E E L I Y L D P H T T Q P A V E A A A D R C P V P D E S F	HsApp4B
255	V I G G K P N S A H Y F I G Y V G E E L I Y L D P H T T Q P A V A A A D R C P V P D E S F	bAut2B1
256	V I G G K P N S A H Y F I G Y V G E E L I Y L D P H T T Q P A V A A A D R C P V P D E S F	bAut2B2
255	V I G G K P N S A H Y F I G Y V G E E L I Y L D P H T T Q P A V E P S D S G C L P D E S F	cAut2B
361	S E M D P S M L I G I L I K G E K D W Q Q W K L E V A E S A I I N V L A K R M D D F D V S C S M D D	Aut2p
301	H C L Q S P Q R R M N I L N L D P S V A L G F F C K E E K D F D N W C S L V Q	HsApp4A
301	H C L Q P P Q R R M N I L N L D P S V A L G F F C K E E K D F D N W C S L V Q	bAut2A
300	H C Q H P P C R M S I A E L D P S I A V G F F C K T E D D F N D W C Q Q V K	HsApp4B
300	H C Q H P P G R M S I A E L D P S I A V V R P P C P A I I G	bAut2B1
301	H C Q H P P G R M S I A E L D P S I A V G F F C H E T E D D F N D W C Q Q V I G S	bAut2B2
300	H C Q H P P C R M S I A E L D P S I A V G F F C H T E E D F N D W C H Q I K	cAut2B
411	V E S V S S N S M K K D A S N N E N L G V L E G D Y	Aut2p
339	K E I L K E N L R M F E L V Q K H P S H W P P F V P A K P E V T T T G A E F	HsApp4A
339	K E I L K E N L R M F E L V Q K H P S H W P P F V P A K P E V T T T G A E F	bAut2A
338	K L S L L G G A L P M F E L V E Q Q P S H L A C P D V L N L S L D	HsApp4B
329	A V L L L L G G A L P M F E L V E Q Q P L L L P P D V L N L S L D	bAut2B1
339	K L S L L L G G A L P M F E L V E Q Q P S H L A C P D V L N L S L D	bAut2B2
338	K L S L L V R G A L P M F E L V E R Q Q P S H F S N P D V L N L S P	cAut2B
437	V D I G A I F P H T T N T E D V D E Y D C F Q D I H C K K Q K I V M G N T H T V N A N L T D Y	Aut2p
378	I D S T E Q L E E F D D C F Q D I H C K K Q K I V M G N T H T V N A N L T D Y	HsApp4A
378	I D S T E Q L E E F D D C F Q D I H C K K Q K I V M G N T H T V N A N L T D Y	bAut2A
371	S S S D V E R L E R F F D S E D E D F	HsApp4B
342	S S S D A E R L E R F F D S E D E D F	bAut2B1
372	S S S D A E R L E R F F D S E D E D F	bAut2B2
370	S S S D A D R L E R F F D S E D E D F	cAut2B
485	E V E G V L V E K E T V G I H S P I D E K C	Aut2p
394	E I L S V	HsApp4A
394	E I L S I	bAut2A
389	E I L S L	HsApp4B
342	E I L S L	bAut2B1
390	E I L S L	bAut2B2
388	E I L S L	cAut2B

Abb. 7: Vergleich der Aminosäuresequenz von Aut2p/Apg4p-Homologen aus Rinder- (bAut2A, bAut2B1, bAut2B2) und Hühnerzellen (cAut2B) mit der des Hefe Aut2p/Apg4p und denen der zwei humanen Proteine HsApp4A, HsApp4B (Kirisako et al., 2000).

Zusätzlich zu den bovinen Sequenzen konnte durch die Verwendung der gleichen Oligonukleotidkombinationen und Klonierungsstrategie wie bei bAut2B2 ausgehend von RNA aus Hühnerzellen eine Sequenz erhalten werden, die aufgrund ihrer Homologie zu bAut2B2, cAut2B genannt wurde (Abb. 7). Ausgehend von boviner RNA waren somit drei unterschiedliche cDNA Sequenzen amplifiziert und in pYES2 Vektoren kloniert worden. Zwei dieser drei Sequenzen unterscheiden sich lediglich im carboxyterminalen Bereich der von ihnen kodierten Aminosäuresequenz, wobei das bAut2B1-Protein 52 Aminosäuren kürzer als das bAut2B2-Protein ist. Beide Sequenzen zeigen Homologie zur humanen HsApg4B Sequenz. Zu dieser Gruppe gehört auch die Hühnersequenz cAut2B, die wie HsApg4B ähnlicher zur bAut2B2 als zur bAut2B1 Sequenz ist. Die dritte Sequenz, bAut2A, ist unterschiedlich zu den vorherigen und besitzt Homologie zur humanen Sequenz HsApg4A. Die Sequenzen der „A“- bzw. „B-Serie“ zeigen über die Artgrenzen hinweg ein erstaunlich hohes Maß an Homologie. Dagegen ist die Verwandtschaft zum Hefe Aut2p zwar deutlich zu erkennen bleibt aber auf bestimmte Regionen, darunter der Bereich mit dem wahrscheinlichen katalytisch aktiven Cystein (Aminosäure #159 in Aut2p/Apg4p), beschränkt.

3.2.3 Analyse der Proteasekandidaten oder die Suche nach einem Testsystem

In weiteren Versuchen sollte analysiert werden, ob LC3 durch eines der von den klonierten Sequenzen kodierten Proteine prozessiert wird. In früheren Versuchen war bereits die Spaltung von Fusionsprotein, bestehend aus einem LC3 Fragment, flankiert von den viralen Nichtstrukturproteinen NS2 und NS3, nach Expression in BHK-Zellen gezeigt worden (Meyers et al., 1998). Mit dieser Zelllinie konnte somit aufgrund der intrinsischen Spaltung kein Funktionstest für die mutmaßlichen Proteasekandidaten durchgeführt werden. Die Idee lag nun nahe, für diese Analysen ein einfaches Expressionssystem zu suchen, das keine intrinsische Spaltungsaktivität für ein LC3 enthaltendes Fusionsprotein besitzt. Es wurden deshalb Zellen von Huhn (HFB-R), Fisch (RTG) und Moskitos (AA) ausgewählt, um ein transientes Expressions Testsystem für LC3 zu etablieren. Vor Koexpressionsversuchen mit den Proteasekandidaten sollte zunächst durch Expression des Substrats getestet werden, ob eine der ausgewählten Zellen keine intrinsische Spaltung zeigte und damit für die geplanten Versuche geeignet war. In ersten Tests zeigten sich Schwierigkeiten, die Expression durch transiente Transfektion zu erreichen. Um diese Probleme zu umgehen, wurde ein Expressionssystem basierend auf dem Sindbis Virus gewählt. Alphaviren sind Plusstrang RNA Viren, die aufgrund ihrer Fähigkeit, einen Wirtswechsel zwischen Säugern und Insekten durchzuführen, ein sehr breites Wirtsspektrum besitzen, und zudem als Vektor zur Expression von Fremdgenen gut etabliert ist. Der verwendete Vektor pSinRep5 enthält eine DNA-Kopie

des Genoms eines autonom replikationsfähigen RNA-Sindbis-Replikons, bei dem die Strukturproteingene, die im Sindbisvirus über einen sugenomischen Promotor und eine separate mRNA exprimiert werden, deletiert wurden. Anstelle der Strukturproteingene befindet sich im pSinRep5 Vektor eine Klonierungsschnittstelle, in die ein Fremdgen inseriert werden kann. Ausgehend von einem SP6-Promotor wird vom pSinRep5 Vektor ein RNA-Replikon transkribiert, das dann, nach Transfektion von Zellen in der Lage ist autonom zu replizieren (Rice et al., 1996; Schlesinger et al., 2001). Ergänzt werden kann dieses System in trans durch ein zweites als DH-EB bezeichnetes RNA-Segment, das die Strukturproteingene enthält (Bredenbeek et al., 1993). Befinden sich beide viralen RNAs in einer Zelle, kommt es zur Bildung von Sindbisviruspartikeln, die in der Lage sind weitere Zellen zu infizieren. Das im Replikon enthaltene Fremdgen wird dabei weiterverbreitet und in hohen Mengen translatiert. Für die weitere Arbeit wurde in die Klonierungsstelle des pSinRep5 eine Sequenz inseriert, die für ein Fusionsprotein, bestehend aus dem ca. 25 kD großen Markerprotein BD („LexA-binding-domain“), der LC3-Insertion und den ersten 96 Aminosäuren von NS3 kodiert; der entstandene Klon wurde pSin-LC3 genannt. Nach Kotransfektion der von pSin-LC3 und DH-EB transkribierten RNA in BHK-Zellen wurde der Virusüberstand dazu verwendet, die anderen Zelllinien zu infizieren. Das jeweilige Zelllysate wurde präpariert, durch SDS PAGE aufgetrennt und nach Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran mit einem kommerziell erhältlichen monoklonalen Antikörper gegen LexA-BD detektiert. In allen getesteten Zellsystemen (BHK, AA, RTG und HFB-R) konnte neben der ungespaltenen Form das Spaltprodukt des Polyproteins nachgewiesen werden (Abb.8). Dieser Befund deutete darauf hin, dass auch in den Zellen der phylogentisch gesehen weit entfernten Spezies die LC3 abhängige Spaltung stattfand. Diese Spaltung schien authentisch zu sein, denn die Größe des Spaltprodukts entsprach dem in BHK-Zellen enthaltenen Protein. Um weitere Hinweise auf die Authentizität der Spaltung zu erhalten, wurde das Konstrukt pSin-LC3 Δ hergestellt, das für das gleiche Fusionsprotein wie pSin-LC3 kodiert, aber eine Deletion von 18 Kodons am 3' Ende der LC3-Insertion aufweist. Die Detektion der Zelllysate von AA, RTG, HFB-R und der Kontrollzelllinie BHK zeigten, dass das Fusionsprotein mit verkürztem LC3-Anteil nicht gespalten wurde (Abb.8). Die Spaltung ist somit in allen Zellen abhängig von der Integrität der LC3-Insertion. Zusammengefasst legen die Daten nahe, dass in allen Zelllinien eine funktionell homologe Protease die Prozessierung des LC3-Substrats durchführt. Diese Protease wurde offensichtlich während der Evolution hoch konserviert.

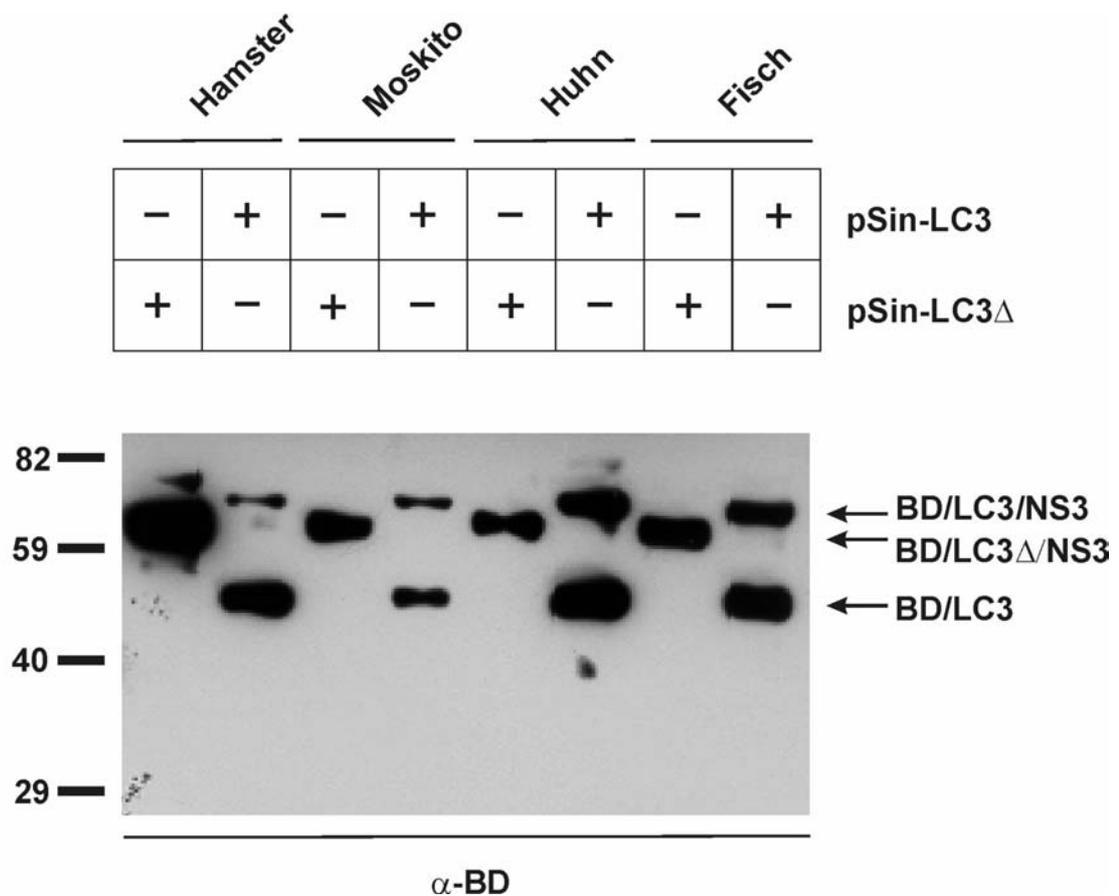


Abb. 8: Expression von Fusionsproteinen mit LC3-Insertion in Zellen unterschiedlichen Ursprungs. Ein Sindbis-Virus-Expressionssystem wurde etabliert, um ein Fusionsprotein bestehend aus dem ca. 25 kD großen Markerprotein BD („LexA-binding-domain“), der LC3-Insertion und den ersten 96 Aminosäuren von NS3 (pSin-LC3), oder dasselbe Protein mit einer Deletion der 18 carboxyterminalen Aminosäuren der LC3-Insertion (pSin-LC3 Δ) zu exprimieren. Proteinextrakte von infizierten Zellen wurden durch SDS PAGE aufgetrennt und nach Transfer auf eine Nitrozellulose Membran mit einem kommerziell erhältlichen monoklonalen Antikörper gegen LexA-BD detektiert. Auf der linken Seite des Gels sind die Größen der Markerproteine in kD angegeben. Die Pfeile auf der rechten Seite des Gels markieren die angegebenen Proteine.

3.2.4 Expression von LC3 in Hefe

Eine weitere Möglichkeit, die mutmaßlichen Proteasen auf ihre Funktion hin zu untersuchen, könnte sich durch Expression in Hefe ergeben. Der niedrige Grad der Homologie zwischen der Hefeprotease und den Proteasekandidaten aus Rind und Huhn nährte die Hoffnung, dass das Säugersubstrat in Hefe nicht gespalten werden sollte.

Wiederum sollte zunächst ein Substratprotein alleine exprimiert werden, um der Frage nach der möglichen intrinsischen Spaltung nachzugehen. Dazu wurde das Konstrukt pLex-B/LC3 etabliert, das für ein Fusionsprotein, bestehend aus der LexA-BD Domäne, den 168 carboxyterminalen Aminosäuren von NS2, der LC3-Insertion und den 96 aminoterminalen Aminosäuren von NS3, kodiert. Als Kontrolle wurde pLex-B/LC3 Δ hergestellt, das für das zuvor beschriebene Fusionsprotein mit der am 3' Ende um 18 Aminosäuren verkürzten LC3-

Insertion kodiert. Um mögliche unspezifische Spaltungen in den viralen Nichtstrukturprotein-Fragmenten identifizieren zu können, wurde ein zusätzliches Kontrollplasmid etabliert, das für ein Fusionsprotein analog dem pLex-B/LC3 Produkt, jedoch ohne LC3-Insertion kodiert. Nach Anzucht der mit je einem von diesen 3 Konstrukten transformierten Hefen in Minimalmedium wurden diese Hefen in flüssiges LB-Vollmedium transferiert und bis zu einer OD_{600} von ca. 0,4 wachsen gelassen. Die Zellen wurden präpariert, durch SDS PAGE aufgetrennt und nach Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran mit einem kommerziell erhältlichen monoklonalen Antikörper (α -LexA) gegen LexA-BD detektiert (Abb.9).

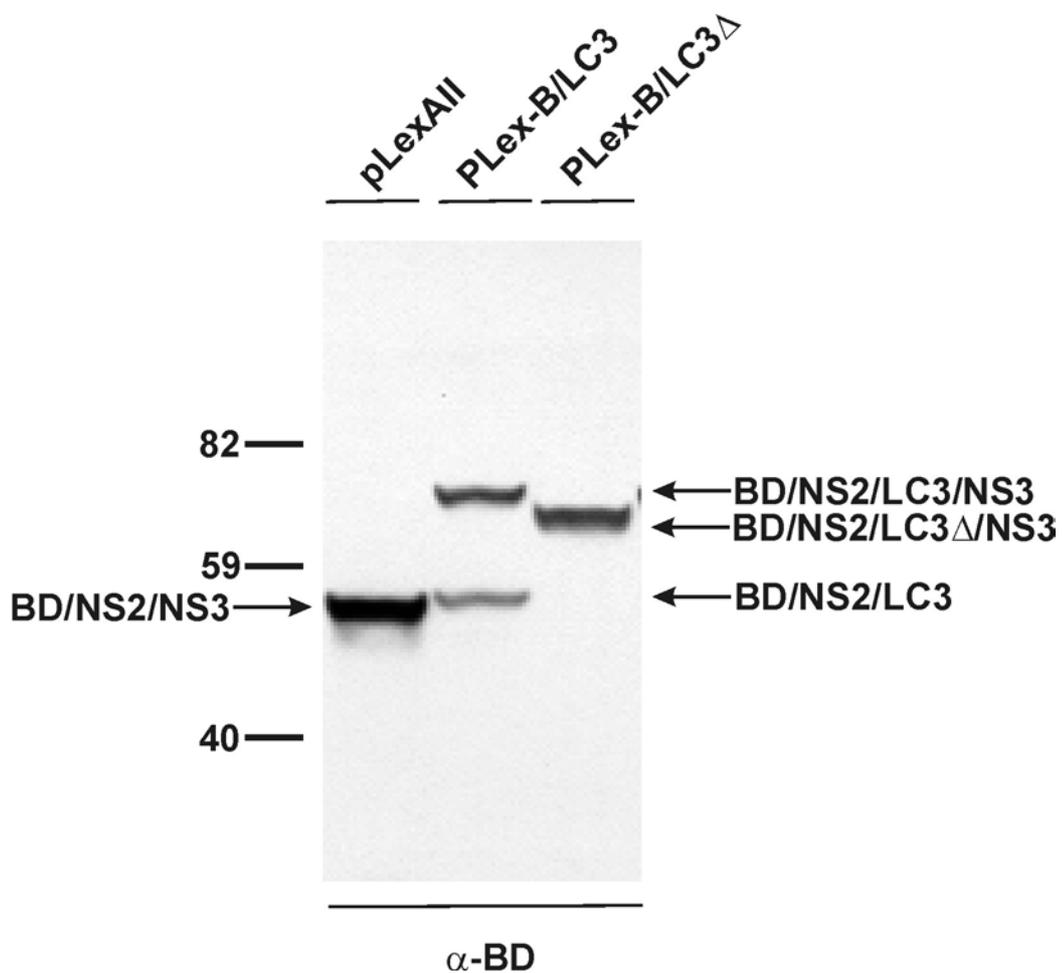


Abb. 9: Untersuchung zur Spaltung von Substratprotein in Wildtyphefe. Hefezellen (egy48) wurden je mit pLexAII (Produkt: BD/NS2/NS3), pLexALC3 (Produkt: BD/NS2/LC3/NS3) und pLexALC3 Δ (Produkt: BD/NS2/LC3 Δ) transformiert. Die Transformanten wurden zur Herstellung von Gesamtproteinextrakten verwendet, das durch SDS PAGE aufgetrennt wurde. Nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurden die Proteine mit anti-LexA-BD detektiert. Auf der linken Seite der Abbildung sind die Größen der Markerproteine in kD angegeben. Die Pfeile auf der rechten Seite des Gels markieren die angegebenen Proteine.

Die Analyse zeigte, dass Hefe eine intrinsische Aktivität besitzt, die in Anwesenheit der vollständigen LC3-Insertion in der Lage ist, das Fusionsprotein zu spalten. Hingegen konnte

für keine der Kontrollen eine entsprechende Prozessierung gezeigt werden (Abb. 9). Das Ergebnis legt die mögliche Spaltung von Säugersubstrat durch Aut2p/Apg4p nahe. Auch wenn die Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse durch eine Reihe von zum Teil ungeklärten Parametern beeinträchtigt wurde, war offensichtlich, dass Wildtyphefe als Testsystem für die Analyse der Proteasekandidaten nicht in Frage kam.

3.2.5 Komplementation einer Aut2 Mutation des Autophagozytosesystems in Hefe

Es wurde kürzlich gezeigt, dass zwei Aut2p/Apg4p homologe Proteine aus *Drosophila* einen Aut2/Apg4 Defekt in Hefe komplementieren können (Thumm und Kadowaki, 2001). Es lag deshalb nahe zu prüfen, ob auch die Säuger- bzw. Hühnerproteasen dazu in der Lage sind. Als Testsystem diente die Messung der Reifung der Aminopeptidase I. Für die ungeriffte Form der Aminopeptidase I (prAPI) ist bekannt, dass sie sich nach der Translation sofort zu Dodekameren zusammenlagert. Diese prAPI-Dodekamere häufen sich durch Rezeptorbindung an Doppelmembranstrukturen an. Die Membran formt sich zu einem CVT-Vesikel, das zur Vakuole transportiert wird. Im Lumen der Vakuole wird prAPI wahrscheinlich, unter Einwirkung von Proteinase B, in mAPI („mature“API) umgewandelt. Transport und Prozessierung von prAPI erfolgt auch während der Autophagozytose. Aus diesem Grund ist API ein ideales Markerprotein für Studien zum Autophagosomentransport unter Hungerbedingungen (Klionsky et al., 1992; Kim et al., 1997; Baba et al., 1997; Scott et al., 1997; Klionsky und Ohsumi, 1999). In Hefezellen mit inaktivierter Protease Aut2p/Apg4p findet kein Transport von prAPI zur Vakuole statt. Die Reifung von prAPI in die reife Form mAPI ist nicht detektierbar (Lang et al., 1998). Die oben genannten *Drosophila*-Aut2p/Apg4p-Homologe waren in der Lage, den Defekt der prAPI-Reifung zu regenerieren (Thumm und Kadowaki, 2001). Aut2p/Apg4p defiziente Hefen wurden mit den die Sequenzen bAut2B1, bAut2B2, cAut2B und bAut2A enthaltenden pYES2 Konstrukten transfiziert und auf ihre Fähigkeit untersucht, prAPI in mAPI umzuwandeln. Die Zellextrakte wurden durch SDS PAGE aufgetrennt und nach Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran mit einem Serum gegen API detektiert. Die Analyse zeigte, dass alle Proteasekandidaten mit Ausnahme von bAut2B1 in der Lage waren, die Reifung von prAPI in Aut2p/Apg4 defizienten Hefen zu regenerieren. Die Bildung von mAPI ist jedoch nicht so effizient wie in Wildtyphefe (Abb. 10).

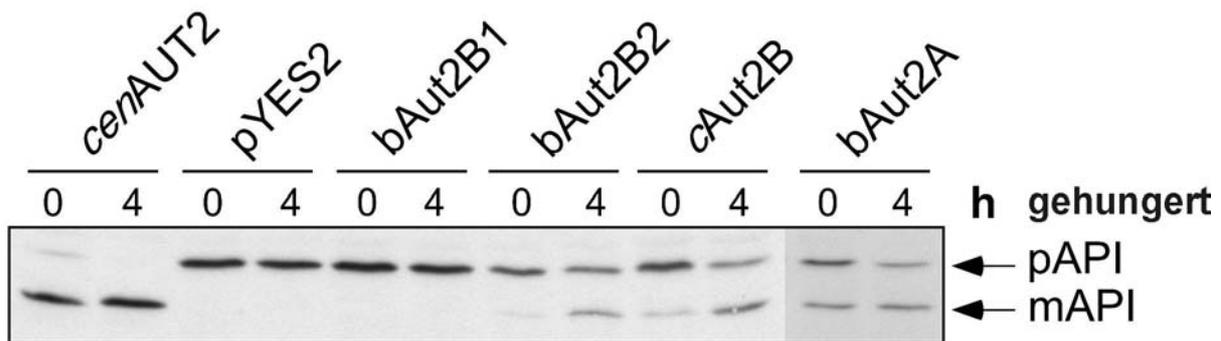


Abb. 10: pAPI-Reifung. Die Autophagozytose ist in Aut2 Δ Hefen blockiert; daraus folgt auch ein Defekt der pAPI-Reifung, der einfach detektiert werden kann. Die unterschiedlichen Proteasekandidaten, die Homologie zum Aut2p/Apg4p besitzen, wurden in Aut2 Δ Hefezellen exprimiert und im Hinblick auf die Fähigkeit getestet, den Defekt der pAPI-Reifung zu beheben. Die Zellen wurden in selektivem Galaktosemedium bis zur stationären Wachstumsphase (0 h gehungert) angezchtet und anschließend für 4 h in 1 % Natriumacetat inkubiert (4 h gehungert). Rohe Zellextrakte wurden durch SDS PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und die Proteine mit Antikörper gegen Proaminopeptidase I detektiert (Lang et al., 1998). Von links nach rechts sind Aut2 Δ -Hefezellen, die das Hefe AUT2-Gen, den pYES2-Vektor und die angezeigten Säugetierproteasekandidaten exprimieren, dargestellt. Der „Western Blot“ wurde von der Arbeitsgruppe M.Thumm Universität Stuttgart zur Verfügung gestellt.

Dieses Ergebnis ist nach heutigem Kenntnisstand nur dadurch zu erklären, dass die fraglichen Proteasen in der Lage sind, das LC3 Homologe Aut7p/Apg8p authentisch zu spalten. Dies könnte bedeuten, dass in Säugerzellen mehrere Proteasen existieren, die in der Lage sind LC3 zu spalten.

3.2.6 Koexpression von Proteasekandidaten und LC3 in Hefe

Es ist naheliegend anzunehmen, dass die beobachtete Spaltung des LC3-Säugersubstrats in Hefe durch die Aut2p/Apg4p Protease erfolgt. Um die Frage zu klären, ob die Proteasekandidaten der höheren Eukaryonten in der Lage sind, das Polyprotein mit LC3-Insertion zu spalten, wurden deshalb Koexpressionen des Substratkonstrukts pLex-B/LC3 mit jeweils einem der Protease-Expressionskonstrukte in Aut2 defizienten Hefen durchgeführt. Nach Anzucht der mit pLex-B/LC3 transformierten Hefen in Minimalmedium (-His) wurden diese Zellen mit jeweils einem der pYES2 Plasmide transfiziert. Die Zellen wurden in Minimalmedium (-His/-Leu) vermehrt. Extrakte dieser Zellen wurden durch SDS PAGE aufgetrennt und nach Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran mit LexA-BD Antikörper detektiert. Zelllysat von pLex-B/LC3 transformierten Zellen wurde als Kontrolle mitgeführt (Abb.11 A linke Spur). Die Substratspaltung sollte in diesem System durch Detektion eines 53 kD großen Proteins erkennbar sein, das im Gegensatz zum 63 kD großen primären Expressionsprodukt den 96 Aminosäuren umfassenden NS3-Anteil nicht mehr enthält. Die Spaltung des Expressionsprodukts von pLex-B/LC3 konnte nur bei Hefen beobachtet werden,

in denen zusätzlich bAut2B2 oder cAut2B, nicht jedoch bAut2B1 oder bAut2A exprimiert wurden (Abb. 11 A).

A

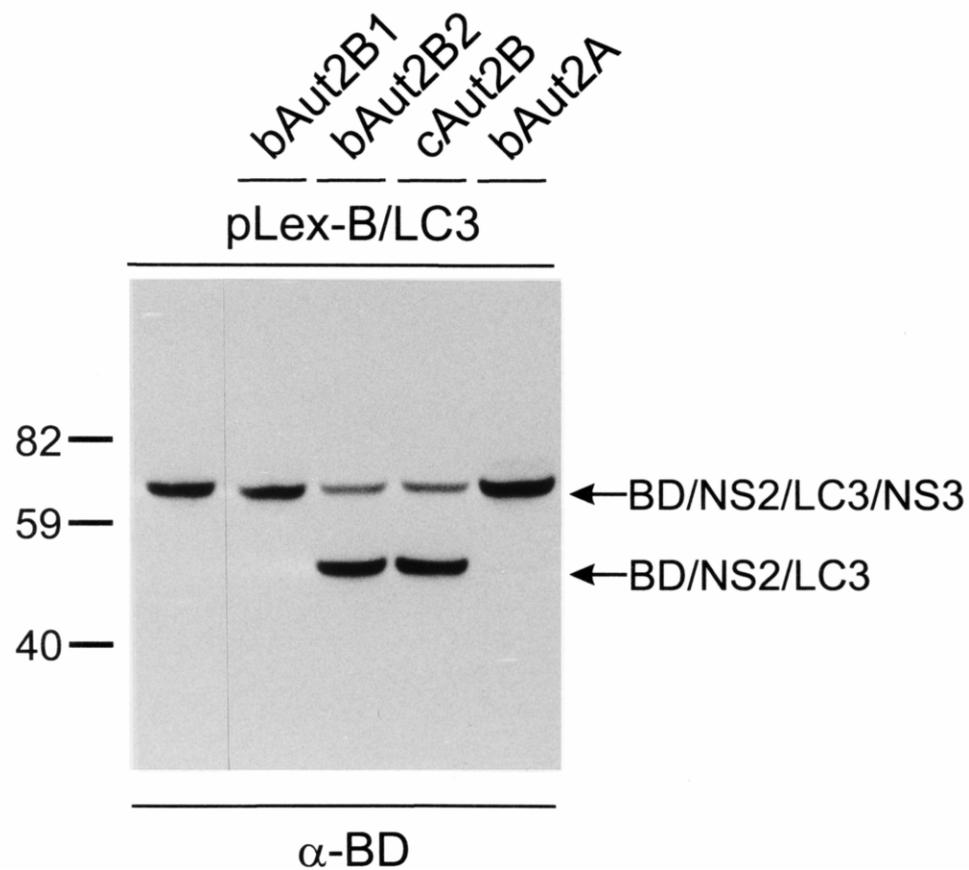


Abb. 11 A: Koexpression von Säugersubstrat mit LC3-Insertion und unterschiedlichen Proteasekandidaten. Das Plasmid pLex-B/LC3, das für ein Fusionsprotein, bestehend aus der LexA-BD Domäne, den 168 carboxyterminalen Aminosäuren von NS2, der LC3-Insertion und den 96 aminoterminalen Aminosäuren von NS3 kodiert, wurde in Aut2Δ Hefen zusammen mit pYES2 alleine oder zusammen mit pYES2 Konstrukten, die für einen der Proteasekandidaten kodieren, (bAut2A, bAut2B1, bAut2B2, cAut2B) exprimiert. Die Proteinextrakte wurden durch SDS PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose Membran transferiert. Die Membran wurde zuerst mit einem monoklonalen Antikörper gegen LexA-BD analysiert (A).

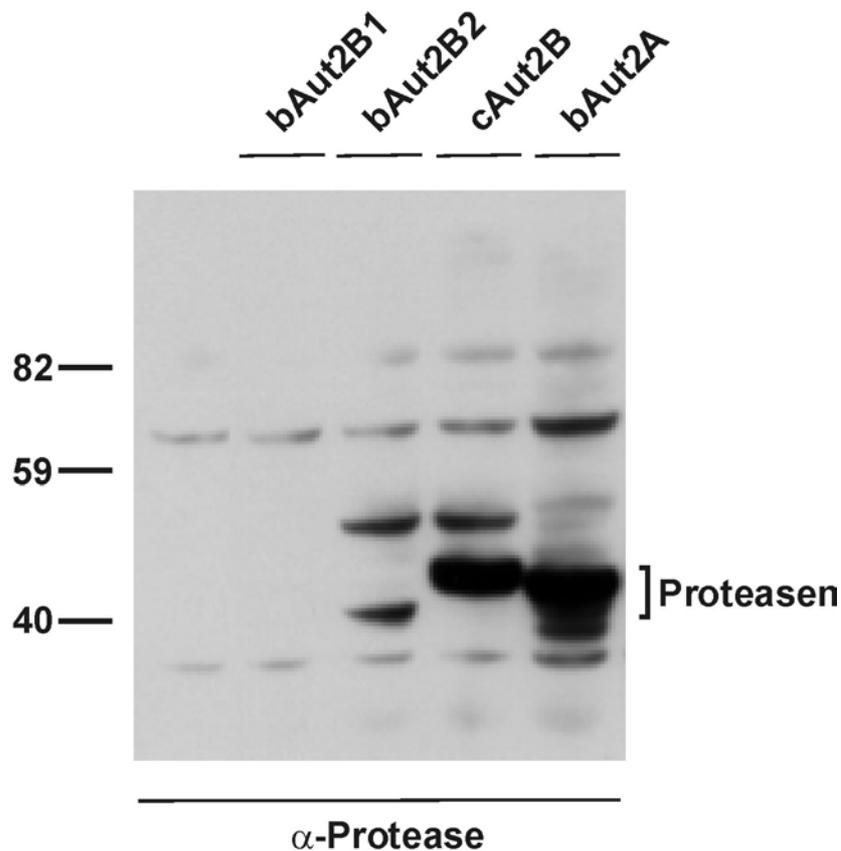
B

Abb. 11 B: Detektion der Säugerproteasen in Hefezellen. Dieselbe Membran, die in (A) zur Detektion der Substratspaltung verwendet worden war, wurde anschließend mit einer Mischung von Antiseren gegen konservierte Regionen innerhalb der „A“- und „B“- Proteasen analysiert (B). Es ist zu beachten, dass in (B) die bereits in (A) detektierten Banden weiterhin sichtbar sind.

Um auszuschließen, dass fehlende Spaltung eine Folge ungenügender Expression oder Stabilität der Proteasen bAut2B1 bzw. bAut2A ist, wurde dieselbe Nitrozellulosemembran wie oben beschrieben mit polyklonalen Seren gegen die Proteasekandidaten der Serie „A“ und „B“ detektiert (Abb. 11 B). Diese Seren waren mit KLH gekoppelten Peptiden erzeugt worden, die konservierte Aminosäurebereiche der Proteasen repräsentierten. Die Kontrollspur (Abb. 11 B, linke Spur) zeigt wie zu erwarten keine spezifische Proteinbande. Die drei Spuren mit den Extrakten aus Zellen, die die Proteasen bAut2B2, cAut2B und bAut2A exprimieren, sollten im Bereich um 40 kD ein spezifisches Signal zeigen (Abb. 11 B, rechts). Für mit Extrakt aus bAut2B1 exprimierenden Zellen fehlte das zu detektierende Produkt.

Damit könnte in diesem Fall der Grund für das Ausbleiben der Spaltung in zu geringer oder gänzlich fehlender Expression von bAut2B1 liegen.

Das Experiment zeigte, dass bAut2B2p die Protease ist, die in Rinderzellen in Abhängigkeit der LC3-Insertion das virale Fusionsprotein spaltet. Das homologe Hühnerprotein, cAut2Bp, ist ebenfalls in der Lage, die Spaltung durchzuführen. Interessanterweise ist bAut2A nicht zu dieser Spaltung fähig, obwohl es Aut2p/Apg4p in der Hefe ersetzen kann.

3.2.7 Analyse der LC3 spezifischen Proteasen in der *in vitro*-Translation

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass ein Fusionsprotein, bestehend aus der LC3-Insertion und Fragmenten der viralen Nichtstrukturproteine NS2 und NS3, während der *in vitro*-Translation in RRL prozessiert wird (Meyers et al., 1998). Um Hinweise zu erhalten, ob auch Pflanzenextrakte Säuger-LC3 spalten können, wurde nach Translation im Weizenkeimextrakt (WG „wheat germ“) nach einer intrinsischen Spaltungsaktivität gesucht. Beim Fehlen solch einer Aktivität sollte dieses System genutzt werden, ein einfaches Verfahren zum Testen der Proteasekandidaten zu etablieren. Gleichzeitig war von der Untersuchung Aufschluss darüber zu erwarten, ob in Pflanzenextrakt Autophagozytosekomponenten existieren, die mit denen von Säugern austauschbar sind.

Als Substrat diente in diesen Untersuchungen ein Protein, das aminoterminal ein kurzes, als pep6 bezeichnetes Markerpeptid besitzt, und zudem LC3 und die ersten 96 Aminosäuren des NS3 enthält. Dieses Substrat wurde durch Translation einer RNA bereitgestellt, die vom Plasmid pSK-LC3 transkribiert worden war. Die Translationsprodukte wurden durch SDS PAGE aufgetrennt und mit Fluorographie detektiert. Nach Translation der Substrat-RNA in RRL wurde wie zu erwarten das 16,5 kD große Spaltprodukt aus pep6 und LC3 erhalten (Abb. 12/1, linke Spur). Als Kontrolle diente eine RNA, die vom Plasmid pSK-LC3 Δ abgeleitet war und wiederum eine Deletion der letzten 18 Kodons des LC3 kodierenden Bereichs aufwies. Das entsprechende Translationsprodukt wird nicht gespalten, so dass eine Bande von ca. 25 kD auftritt (Abb.12/1, 2.Spur). Beide Fusionsproteine werden nach Translation in WG nicht gespalten (Abb.12/1, 3. und 4. Spur). Aufgrund dieses Ergebnisses sollte auch in diesem System durch Kotranslation von Protease und Substrat die Aktivität aller Proteasekandidaten überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden ausgehend vom T7-Promotor der pYES2 Plasmide die für die Proteasekandidaten kodierenden RNAs transkribiert. Die jeweilige Protease kodierende RNA wurde entweder für sich alleine oder in Kombination mit einer der beiden Substrat-RNAs in WG translatiert. Analyse der Spuren 4., 5. und 6. der Abb. 12/1 zeigt, dass die Protease bAut2B2 das authentische Substrat spaltet, nicht aber das Protein mit verkürzter LC3-Insertion. Die Spaltung des Substrats ist anhand der Proteinbande von

ca. 16,5 kD zu erkennen, die mit dem Spaltprodukt der RRL Translation komigriert. In Analogie wurde die Spaltung des Substrats durch cAut2B gezeigt (Abb.12/1, Spuren 8, 9, 10).

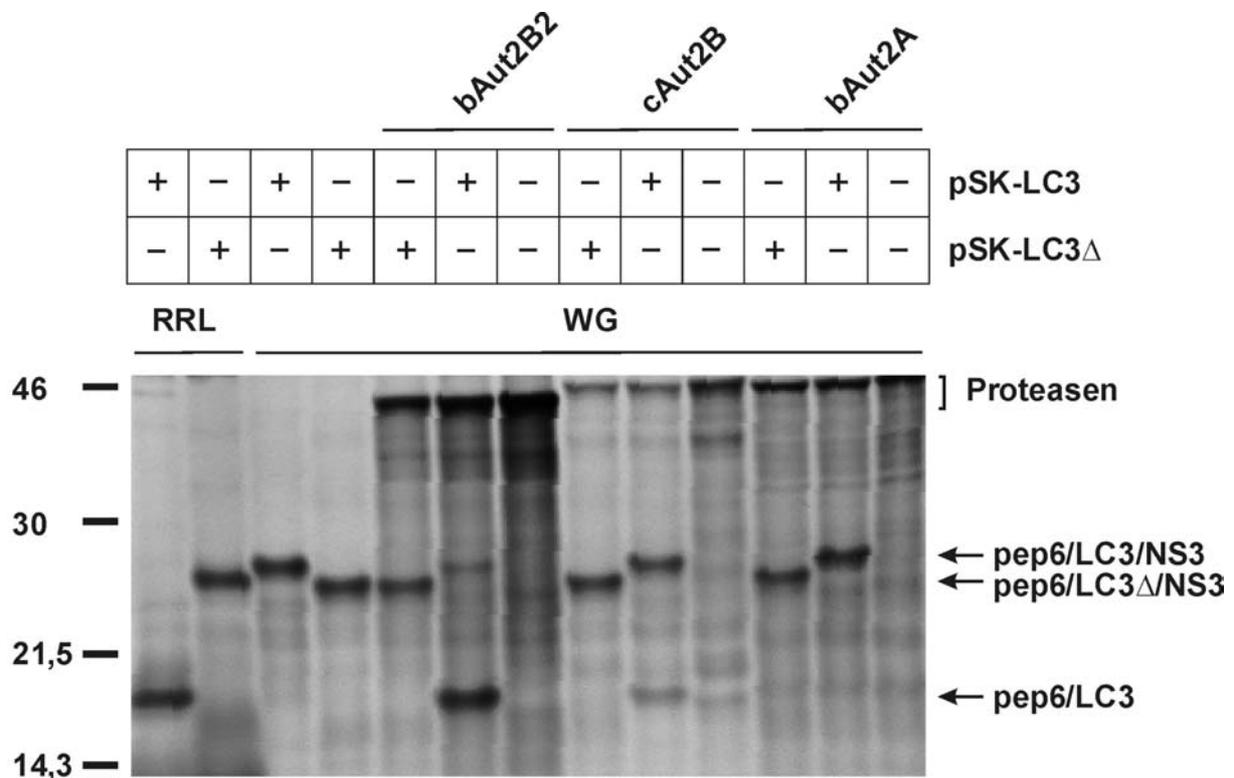


Abb. 12/1: Koexpression von viralem Fusionsprotein und Proteasekandidaten *in vitro*. bAut2A, bAut2B2, oder cAut2B wurden durch *in vitro* Translation in RRL („rabbit reticulocyte lysate“) oder WG („wheat germe“) Translationsystem zusammen mit einem Säugersubstrat exprimiert. Das Substratprotein bestand aus einem Teil des BVDV NS2 (pep6), der LC3-Insertion und den ersten 96 Aminosäuren von NS3 (Plasmid: pSK-LC3; Produkt: pep6/LC3/NS3). Als Kontrolle diente ein äquivalentes Protein, bei dem die letzten 18 Aminosäuren von LC3 deletiert waren (Plasmid: pSK-LC3Δ; Protein: pep6/LC3Δ18/NS3). Die Produkte wurden während der *in vitro* Translation mit [³⁵S] markiert. Translationsprodukte wurden durch SDS PAGE aufgetrennt und fluorographisch detektiert. Die Zahlen am linken Rand geben die Molekulargewichte von Standardproteinen in kD an.

Im Gegensatz dazu konnte für die Proteasen bAut2B1 und bAut2A keine Spaltung beobachtet werden. Da in diesem System auch die Translation von bAut2B1 detektiert werden konnte, ist das Ausbleiben der Spaltung des Substrats in diesem Fall nicht mit dem Fehlen der Protease zu erklären, woraus geschlossen werden kann, dass dieses Protein LC3 nicht spaltet (Abb. 12/2).

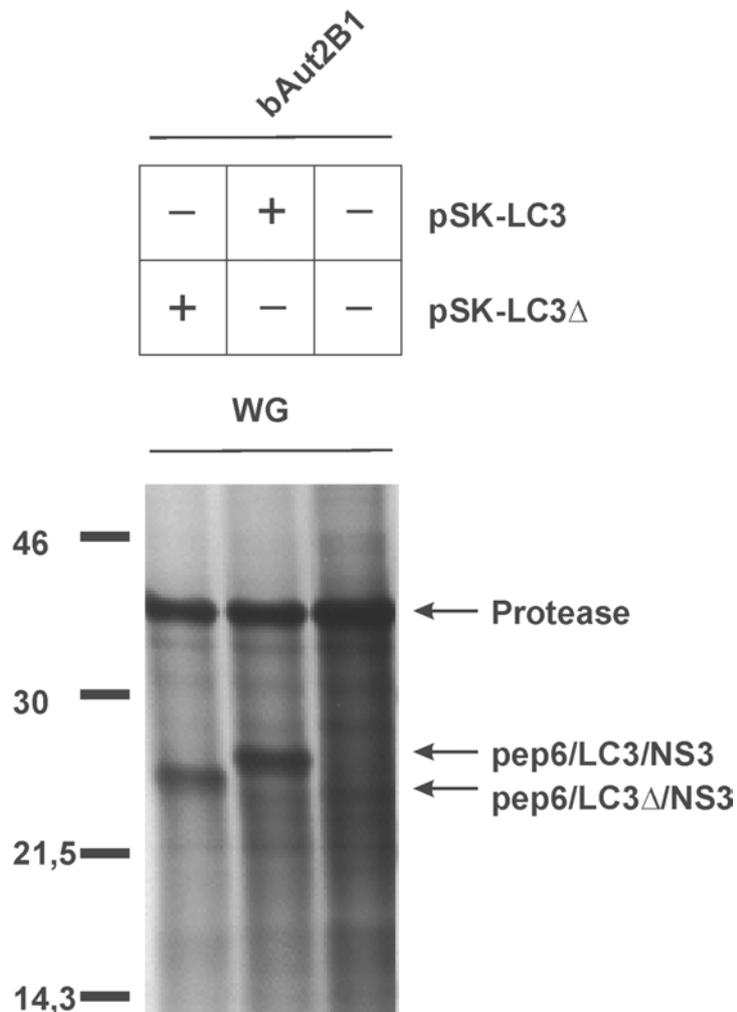


Abb. 12/2: Fortsetzung der Abb. 12/1. Koexpression von viralem Fusionsprotein und dem Proteasekandidaten bAut2B1 wie zuvor beschrieben.

Um zu zeigen, dass nicht nur virales Fusionsprotein, sondern auch zelluläres LC3 durch die Proteasen bAut2B2 und cAut2B gespalten wird, musste zuerst das vollständige bovine LC3 kodierende Gen isoliert werden. Hierzu wurde eine Milz-cDNA-Genom-Bibliothek durchsucht. Die Phagen der λ -Uni-Zap-XR Bibliothek (Stratagene) wurden zur Infektion von *E.Coli*-Zellen verwendet, die dann auf Agarplatten ausplattiert wurden. Nach Plauebildung wurde ein Abdruck der Agarplatte auf einer Nitrozellulosemembran hergestellt. Die auf die Membran übertragenen Phagen wurden lysiert und die cDNA denaturiert. Die gebundene DNA wurde mit einer radioaktiv markierten komplementären LC3-Sonde hybridisiert. Positive Klone wurden nach Abgleich mit der Agarplatte isoliert. Die eluierten Phagen wurden durch *in vivo*-Exzision mit dem Helferphagen R408 in ein pBluescript-Plasmid überführt. In Bakterien vermehrte und daraus isolierte Plasmide mit von LC3-Genen abgeleiteten Inserts wurden sequenziert. Dabei zeigte sich, dass die bovine LC3-Aminosäuresequenz der veröffentlichten Sequenz der Ratte bis auf den carboxyterminalen

Teil, der dem Gly #120 folgt, entspricht. Das zelluläre bovine Protein weist damit gegenüber der LC3-Insertion im viralen Polyprotein am Aminoterminus 4 und am Carboxyterminus 5 zusätzliche Aminosäuren auf. Entsprechend der Theorie sollten die 5 carboxyterminalen Reste, die auf das Gly #120 folgen, postranslational durch Proteasespaltung entfernt werden. Die Plasmide mit LC3 Insert dienen als Matrize zur Amplifikation der kodierenden Sequenz. Das Konstrukt pSK-zLC3 kodiert für das authentische bovine LC3, das aminoterminal von einem pep6-tag (18 Aminosäuren des Caroxyterminus von BVDV NS2) und carboxyterminal von kurzen Markerpeptiden, VP5 und Hexahistidin, flankiert wird. Nach Translation des von pSK-zLC3 abgeleiteten RNA in RRL, konnte ein ca. 16,5 kD großes Protein detektiert werden. Ein Protein dieser Größe ist zu erwarten, wenn das LC3 nach Position Gly #120 gespalten wird. Im Gegensatz dazu konnte nach *in vitro*-Translation in WG keine Spaltung beobachtet werden (Abb. 13, linke Spur).

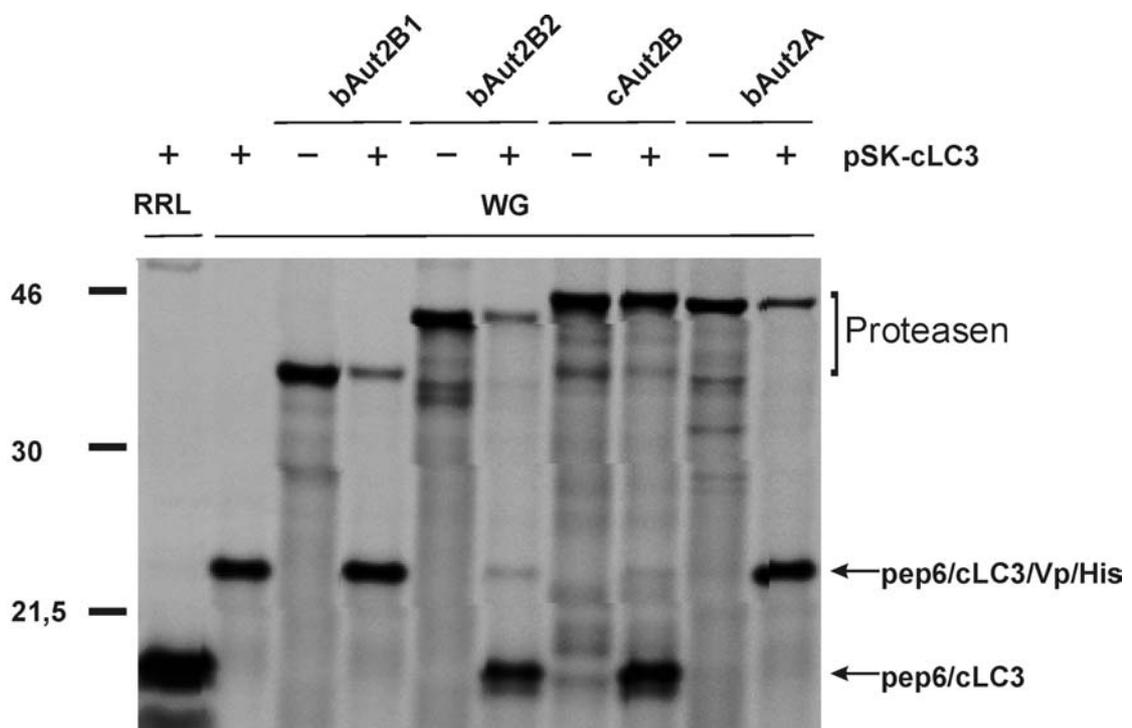


Abb. 13: Koexpression von zellulärem LC3 und Proteasekandidaten. Die bovine LC3-Sequenz wurde in voller Länge einschließlich des natürlichen carboxyterminalen Anhangs von 5 Aminosäuren wie angezeigt entweder in RRL oder WG exprimiert. Das LC3 wurde zusammen mit kurzen Markerpeptiden in der Folge pep6/LC3/VP/His exprimiert (Plasmid: pSK-cLC3; Produkt: pep6/LC3/VP/His). Das Substratprotein wurde entweder alleine oder zusammen mit den Proteasen bAut2A, bAut2B1, bAut2B2I, oder cAut2B exprimiert. Die mit [³⁵S] markierten Translationsprodukte wurden durch SDS PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und fluorographisch ausgewertet. Die Molekulargewichte von Standardproteinen in kD sind am linken Rand der Abbildung angegeben.

Wiederum sollte durch Kotranslation von Protease und Substrat untersucht werden, ob eine der Proteasen das Substrat spaltet. Wiederum konnte für bAut2B1 und bAut2A kein Spaltprodukt nachgewiesen werden (Abb. 13, Spuren 4 und 10). Im Gegensatz dazu führte die Kotranslation mit bAut2B2 und cAut2B zu einer Spaltung des Substrats (Abb. 13, Spuren 6 und 7). Damit ist gezeigt, dass die Proteasen bAut2B2 und cAut2B das zelluläre LC3 ebenso wie das virale Polyprotein spalten.

3.2.8 Verlust der Spaltung durch Verkürzung der LC3 Insertion

Der bei allen aus Jasper isolierten Rekombinanten konservierte LC3 kodierende Sequenzanteil lässt auf eine funktionelle Notwendigkeit der Integrität der LC3-Insertion für den Mechanismus der Polyproteinprozessierung der *zp* Viren schließen. Um die funktionelle Notwendigkeit von LC3 für die Spaltung des viralen Polyproteins klären zu können, wurden transiente Expressionsstudien im T7-Vacciniavirus-System durchgeführt. Dieses Expressionssystem beruht auf der Möglichkeit, die RNA Polymerase des Bakteriophagen T7 in funktioneller Form in eukaryontischen Zellen zur Verfügung zu stellen. Dies wird durch Infektion mit rekombinantem Vacciniavirus erreicht, das die T7 RNA Polymerase exprimiert. Nach Transfektion von Plasmiden mit einem T7 Promotor werden intrazellulär T7-Transkripte vom Plasmid synthetisiert, die als Matrizen für die Translation des gewünschten Proteins dienen. Das Konstrukt pEx7/JaCP kodiert für ein Fusionsprotein, bestehend aus einem NS2-Fragment, der LC3-Insertion, NS3 und einem NS4-Fragment (Meyers et al., 1998). Ausgehend von diesem wurde eine ganze Reihe von Konstrukten angefertigt, die sich von pEx7/JaCP durch eine carboxyterminal (um 5, 18 Aminosäuren) oder eine aminoterminal (um 7, 21, 28, 38 Aminosäuren) verkürzte LC3-Insertion unterscheiden. Die mit Vacciniavirus infizierten BHK-Zellen wurden mit diesen Konstrukten transfiziert. Als Kontrolle wurden nichttransfizierte bzw. mit pEx7/JaCP transfizierte infizierte BHK-Zellen verwendet. Die mit [³⁵S] markierten Proteine wurden mit NS3 bzw. NS2 spezifischen Antikörpern durch Immunpräzipitation isoliert. Für die Präzipitation von NS2 wurde das Serum anti-pep6, für die Nichtstrukturproteine NS2-3 bzw. NS3 das Serum anti-A3 verwendet (Tautz et al., 1996; Thiel et al., 1991). Das Präzipitat wurde durch SDS PAGE aufgetrennt und das Autoradiogramm am „Phospho-Imager“ quantitativ ausgewertet. Mit dem Serum anti-pep6 konnte das ungespaltene Substrat als Einzelbande von ca. 115 kD für alle Fusionsproteine detektiert werden (Abb.14).

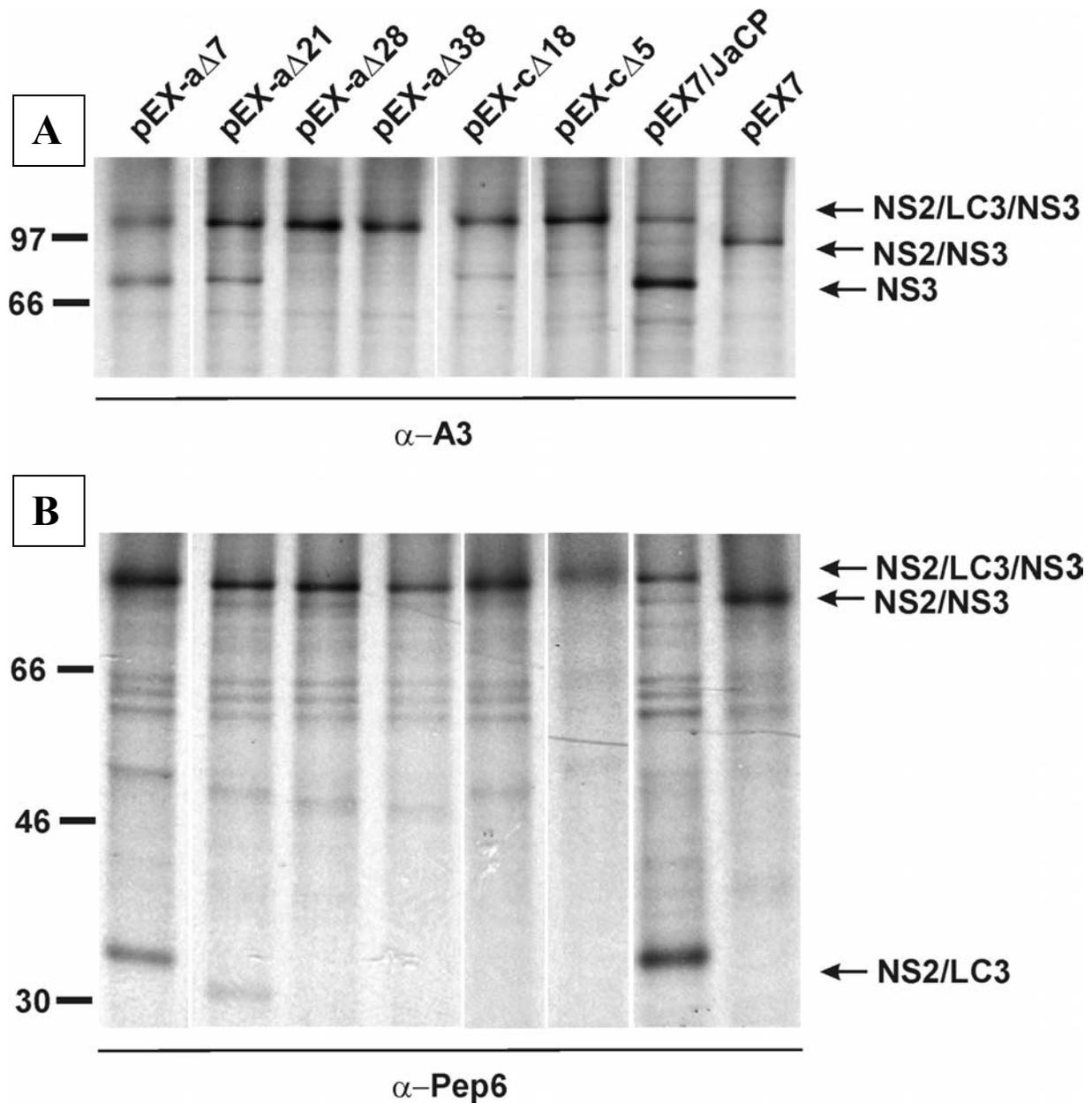


Abb. 14: Expression von Fusionsproteinen mit carboxyterminal bzw. aminoterminal verkürzter LC3-Insertion in BHK-Zellen. BHK-Zellen wurden mit T7-Vacciniavirus (MVA-T7) infiziert. Anschließend wurden sie mit einer Reihe von pEX7-Vektoren transfiziert, die je für ein Fusionsprotein, bestehend aus einem NS2-Fragment, der LC3-Insertion, NS3 und einem NS4-Fragment, kodieren. Die LC3-Insertionen der Konstrukte waren um 5 oder 18 Aminosäuren carboxyterminal bzw. um 7, 21, 28 und 38 Aminosäuren aminoterminal verkürzt (Spur 1-6). Als Kontrolle dienten BHK-Zellen, die mit pEX7/JaCP transfiziert wurden. Dieses Konstrukt kodiert für ein Fusionsprotein mit unverkürzter LC3-Insertion. Als weitere Kontrolle diente pEX7 (Produkt: NS2/NS3/NS4) (Spur 7 und 8). Nach metabolischer Markierung wurden die Zellextrakte für die Immunpräzipitation verwendet. Die Präzipitate wurden durch SDS PAGE aufgetrennt und fluorographisch ausgewertet. Die Immunpräzipitation erfolgte entweder mit dem Serum anti A3 (A) oder dem Serum anti pep6 (B). Die exprimierten Proteine sind mit Pfeilen auf der rechten Seite des Gels markiert; die Größen von Markerbanden sind in kD angegeben.

Nur für die zwei ersten aminoterminalen Verkürzungsstufen und pEx7/JaCp ist das Spaltprodukt NS2/LC3 Δ zu detektieren, das aufgrund unterschiedlich verkürzter LC3-Insertionen im Bereich von 30 - 34 kD läuft (Abb. 14 (B) Spur 1,2 und 7). Mit dem Serum anti-A3 war neben der 115 kD Bande auch das ca. 72 kD große abgespaltene NS3-Protein zu beobachten (Abb. 14 (A) Spur 1,2 und 7). Es ist zu beachten, dass die detektierte Bande den NS4-Anteil nicht mehr enthält, da dieser von der NS3 enthaltenen Serinprotease abgespalten wurde.

Nach Expression von Fusionsproteinen mit carboxyterminal verkürztem LC-Anteil konnten keine Spaltprodukte detektiert werden. Dagegen führt die aminoterminal Verkürzung der LC3-Insertion erst ab einer Verkürzung von mehr als 21 Aminosäuren zum Verlust der Spaltung. Damit ist gezeigt, dass der überwiegende Anteil des LC3 für die Prozessierung erforderlich ist, und der C-Terminus dafür eine essentielle Funktion hat.

3.2.9 Veränderung der Polyproteinprozessierung durch Punktmutationen

Die LC3 induzierte Spaltung des viralen Polyproteins erfolgt nach dem carboxyterminal konservierten Glycin #120 der zellulären Insertion (Meyers et al., 1998). Erst kürzlich wurde für das Säugetier-LC3 beschrieben, dass ein Austausch an dieser Position von Glycin nach Alanin zum fast vollständigen Verlust der Bildung der aktivierten LC3 I Form führt (Kabeya et al., 2000). Für die meisten der bis heute gefundene LC3-Homologe ist die Aminosäurefolge T F G direkt vor der Spaltstelle konserviert (Lang et al., 1998). Die Bedeutung der Integrität dieses Motivs konnte zuvor schon aus dem Einfluss der carboxyterminalen Verkürzungen der LC3-Insertion auf die Spaltung abgeleitet werden. Die Veränderung der Spalteffizienz in Abhängigkeit von diesen Austauschen im Motiv bzw. der folgenden NS3 kodierenden Sequenz sollte durch Einführung Punktmutationen untersucht werden. Die Untersuchung erfolgte ebenfalls durch transiente Expressionsstudien im T7-Vacciniavirus-System. In das zuvor schon beschriebene Konstrukt pEx7/JaCP wurde in das 5. Kodon nach der LC3 kodierenden Sequenz eine stumme Punktmutation eingeführt, so dass eine Restriktionsendonukleasespaltstelle für Pst I entstand. Die LC3 Insertion konnte nun durch Behandlung mit Pst I und BamHI aus dem Konstrukt entfernt werden. Durch PCR mit Ol-a Δ 0 sowie unterschiedlichen Oligonukleotiden, mit denen die gewünschten Sequenzveränderungen eingeführt werden konnten, wurden Amplikons generiert, die für die gesamte LC3-Insertion und 5 Aminosäuren des NS3 mit Aminosäureaustauschen an den einzelnen Positionen im Bereich der Spaltstelle kodieren.

Diese Amplikons wurden in das pEx7/JaCP Konstrukt inseriert. Die mit Vacciniavirus infizierten BHK-Zellen wurden mit diesen Konstrukten transfiziert. Als Kontrollen dienten pEx7/JaCP und pEx7. Das Konstrukt pEx7 kodiert für ein identisches Fusionprotein wie pEx7/JaCP, jedoch ohne LC3-Insertion (Meyers et al., 1998). Die exprimierten Proteine wurden wie oben analysiert, und die Spalteffizienz nach Auswertung am „Phospho-Imager“ berechnet.

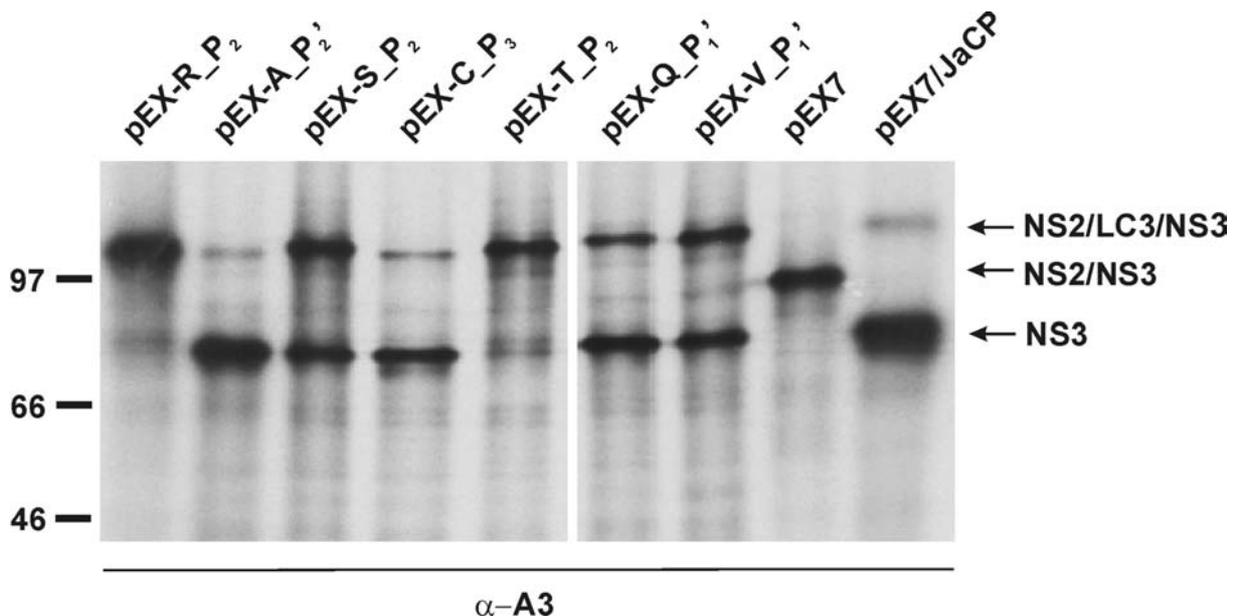


Abb. 15: Einfluss von Punktmutationen auf die Polyproteinprozessierung. Mit T7-Vacciniavirus (MVA-T7) infizierte BHK-Zellen wurden mit einer Reihe von pEX7-Vektoren transfiziert, die für ein Fusionsprotein mit unterschiedlichen Punktmutationen im Bereich der Spaltstelle zwischen LC3 und NS3 kodieren (Produkt: NS2/LC3/NS3/NS4). Dabei wurden die ursprünglichen Aminosäuren der Spaltstellen P₃ (T), P₂ (F), P₁ (G), P₁' (G) oder P₂' (P) durch die jeweilige im Konstruktamen angegebene Aminosäure ausgetauscht. Die Position des Austauschs ist am Ende des Konstruktamen angegeben.

Die mit [³⁵S] markierten Protein wurden durch SDS PAGE aufgetrennt und fluorographisch ausgewertet. Die Immunpräzipitation erfolgte mit dem Serum anti-A3. Auf der linken Seite des Gels sind die Größen der Markerproteine in kD angegeben. Die Pfeile auf der rechten Seite des Gels markieren die angegebenen Proteine.

Mit Ausnahme von pEx7 (Abb.15, Spur 8) war für alle Konstrukte das ungespaltene Fusionsprotein als Proteinbande von ca. 115 kD zu beobachten; allerdings war offensichtlich, dass die Intensität der Bande erheblich variierte. In Abhängigkeit von der jeweiligen Punktmutation wurde das 72 kD große Spaltprodukt NS3 in unterschiedlicher Menge gebildet, jedoch nur, wenn die LC3-Insertion vorhanden war (Abb. 15). In Abwesenheit der zellulären Sequenz war nur das ungespaltene Expressionsprodukt ohne LC3 mit einer Größe von 97 kD zu sehen; der NS4-Anteil des Fusionproteins wurde durch die in NS3 enthaltenen Serinprotease abgespalten.

Nach quantitativer Auswertung mehrerer Autoradiogramme am „Phospho-Imager“ wurde die Effizienz der Polyproteinspaltung bestimmt, indem der Anteil des NS3 an der Gesamtmenge des Expressionsprodukts bestimmt wurde. In Tab. 11 sind die Werte der Spalteffizienzen in Prozent gegen die jeweilige Punktmutation aufgetragen.

TABELLE 11

Einfluss von Punktmutationen auf die Polyproteinprozessierung

Ursprüngliche Aminosäure	Position	Aminosäureaustausch (Spaltstelle)	Spaltung in %
P	P ₂ '	A	95,9
G	P ₁ '	V	65,5
G	P ₁ '	Q	86
G	P ₁ '	W	79
G	P ₁ '	R	80
G	P ₁ '	E	71
G	P ₁	R	28,5
G	P ₁	E	14
G	P ₁	P	17
G	P ₁	C	18,3
G	P ₁	F	13,7
G	P ₁	A	49
F	P ₂	T	20
F	P ₂	S	46
F	P ₂	R	10
F	P ₂	C	19
F	P ₂	H	37
F	P ₂	A	24
F	P ₂	W	22,7
F	P ₂	E	10
T	P ₃	C	94,1

Tab. 11: Spalteffizienzen in Abhängigkeit unterschiedlicher Punktmutationen. Expressionsversuch mit anschließender Immunpräzipitation für eine Reihe von pEX7-Vektoren die für ein Fusionsprotein (Produkt: NS2/LC3/NS3/NS4) mit unterschiedlichen Punktmutationen im Bereich der Spaltstelle LC3-NS3 kodieren, zeigten unterschiedliche Spalteffizienzen. Diese wurden am „Phospho-Imager“ quantitativ ausgewertet. Unter Berücksichtigung der Anzahl der im Fusionsprotein radioaktiv markierten Methionine und Cysteine konnte der prozentuale Anteil des abgespaltenen NS3 (siehe Abb. 15) im Verhältnis zum gesamten Expressionsprodukts ermittelt werden, wobei der theoretisch berechnete Wert des nichtdetektierten NS2/LC3-Anteils mit eingerechnet wurde. In der Tabelle sind die Position und der durchgeführte Aminosäureaustausch im Vergleich zur ursprünglichen Sequenz P₃ (T), P₂ (F), P₁ (G), P₁' (G) oder P₂' (P) aufgelistet.

Das Experiment zeigt deutlich die Abhängigkeit der Effizienz der Polyproteinprozessierung von den Aminosäuren an den Positionen P₁ und P₂. Durch keinen Aminosäureaustausch konnte die Spaltung jedoch vollständig blockiert werden.

4 Diskussion

Alle vier Spezies der Pestiviren, das bovine virale Diarrhö Virus Typ 1 und 2 („bovine viral diarrhoea virus“, BVDV), das Schweinepestvirus („classical swine fever virus“, CSFV) und das „border disease virus“ (BDV), kommen in der Natur in zwei verschiedenen Biotypen vor, die sich in ihren Auswirkungen auf die infizierte Zelle unterscheiden: Zytopathogene (zp) Viren lysieren die Wirtszellen, während nichtzytopathogene (nzp) Viren ohne sichtbare Auswirkungen auf die Wirtszelle replizieren. Die molekularen Ursachen für die Existenz der zwei Biotypen blieben lange Zeit unklar. Für das BVDV konnte ein spezifischer Unterschied zwischen nzp und zp im Proteinmuster der infizierten Wirtszelle festgestellt werden: In Zellen, die mit zp Virus infiziert wurden, ließ sich neben einem Fusionsprotein, bestehend aus den viralen Nichtstrukturproteinen NS2 und NS3 (NS2-3), auch das Nichtstrukturprotein NS3 nachgewiesen, wohingegen in mit nzp Virus infizierten Zellen ausschließlich das Fusionsprotein NS2-3 detektiert werden konnte. Ein wichtiger Befund war, dass die BVDV-Biotypen mit der Entstehung der Schleimhauerkrankung der Rinder, „mucosal disease“, (MD), in Zusammenhang zu stehen. MD ist eine sporadisch auftretende Krankheit bei Rindern, die oft zwischen dem 6. Lebensmonat und dem 2. Lebensjahr ausbricht. Die Krankheit führt innerhalb von ca. zwei Wochen nach Auftreten erster klinischer Symptome zum Tod (Baker, 1987). Zum Ausbruch von MD kommt es nur nach intrauteriner Infektion einer trächtigen Kuh im ersten Drittel der Trächtigkeit mit einem nzp BVD-Virus (Liess et al., 1984). Der Fötus eines solchen Tieres entwickelt eine Immuntoleranz, die in eine persistente Infektion übergeht. Während der persistenten Infektion kommt es aufgrund der Toleranz nicht zur Bildung von zytotoxischen T-Zellen und spezifischen Antikörpern. Die Immuntoleranz beschränkt sich auf den Virusstamm der intrauterinen Infektion. Beide Formen von BVDV, zp und nzp, wurden konsistent in Tieren gefunden, die an MD zugrunde gegangen waren (McKercher et al., 1968; Brownlie et al., 1984; Bolin et al., 1985). Die aus einem Tier isolierten zp und nzp Viren sind serologisch (antigenisch) eng verwandt und werden als Viruspaar bezeichnet (Pocock et al., 1987; Corapi et al., 1988). Das zp Virus gelangt entweder durch Superinfektion in das persistent infizierte Tier oder entsteht in ihm durch Mutation des nzp Virus. Vergleichende Genomanalysen haben gezeigt, dass sich zp BVD-Viren im Vergleich zu nzp BVD-Viren durch eine Reihe von Genomveränderungen unterscheiden. Es wurden sowohl nichthomologe RNA-Rekombinationen als auch vielfache Punktmutationen in den Genomen von zp Viren identifiziert. Die RNA-Rekombinationen umfassen Insertionen zellulärer Sequenzen, meistens flankiert von Duplikationen viraler

Sequenzen, Deletion viraler Sequenz und damit verbundene Bildung von defekten Viren („defective interfering particles“, DIs), Duplikationen viraler Sequenz in unterschiedlicher Größe (27 Nukleotide bis 2kb) in Verbindung mit Neuordnung des Genoms, manchmal verbunden mit einer Leserasterverschiebung.

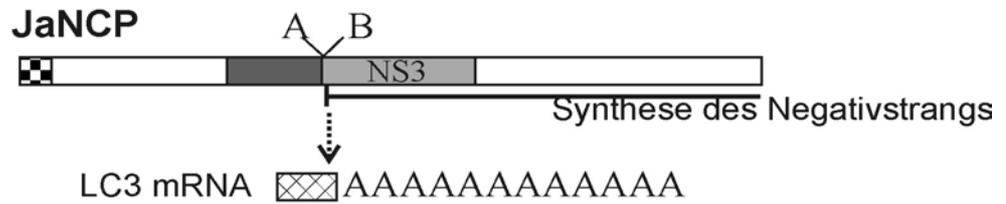
Durch welchen Mechanismus die spezifischen Genomveränderungen die NS3-Expression beeinflussen wird, konnte für einige zp BVD-Viren nachgewiesen werden. Die Integration einer Ubiquitin kodierenden Sequenz in das Genom der BVDV Stämme Osloss und CP14 führt zu einer zusätzlichen Spaltung des viralen Polyproteins durch Ubiquitin carboxyterminale Hydrolasen (UCH) und damit zur Freisetzung von NS3 (Meyers et al., 1991; Tautz et al., 1993). Ein anderer Mechanismus zeigt Abspaltung von NS3 durch die autoproteolytische Aktivität des N^{pro}- Proteins. Das Genom des Stammes Pe515CP besitzt für diesen Zweck zwei virale Duplikationen, wobei die kurze für N^{pro} kodiert, und die lange für NS3 und stromabwärts davon gelegene Sequenzen. Das duplizierte N^{pro} befindet sich im Polyprotein direkt vor dem Aminoterminus des duplizierten NS3 (Meyers et al., 1992). Beim Stamm CP9 findet sich als zytotahtogenes Agens ein DI, bei dem der gleiche Mechanismus zur Freisetzung von NS3 genutzt wird. Allerdings sind im DI-Genom keine Sequenzen dupliziert, sondern die Gene für Strukturproteine, p7 und NS2 deletiert, so dass sich wiederum im Polyprotein NS3 an N^{pro} anschließt (Tautz et al., 1994). In vielen anderen Fällen ist jedoch der Mechanismus, der zur Freisetzung von NS3 führt, nicht bekannt; so bedarf es weiterer Anstrengungen zur Aufklärung der Vorgänge und zur Bestimmung der Proteasen, die an dem Prozeß beteiligt sind. Die vorliegenden Daten legen als generelles Prinzip nahe, dass die spezifischen Genomveränderung bei zp BVDV-Stämmen letztlich die Einführung einer zusätzlichen Spaltstelle in das virale Polyprotein am aminoterminalen Ende von NS3 bewirken.

Bei Jasper, einem jungen Bullen, der an MD verendete, konnte ein Viruspaar isoliert werden. Das zp BVD-Virus JaCP weist eine durch RNA-Rekombination hervorgerufene Genomveränderung auf. Hierbei handelt es sich um eine LC3 kodierende Insertion, die für ein Fragment des zellulären Proteins LC3 kodiert, und um flankierende Duplikationen viraler Sequenzen. Es konnte gezeigt werden, dass LC3 für die Freisetzung von NS3 verantwortlich ist (Meyers et al., 1998). Weitere Untersuchungen ergaben Hinweise darauf, dass zusätzlich zu JaCP weitere BVDV Rekombinanten im Tier vorhanden waren. Aus dem Serum von Jasper wurde in der Folge eine Reihe weiterer zp Viren isoliert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Virusisolate auf genomischer Ebene analysiert. Dabei zeigte es sich, dass diese eng verwandt mit dem zp BVDV JaCP waren. Die Rekombinanten enthalten neben unterschiedlichen

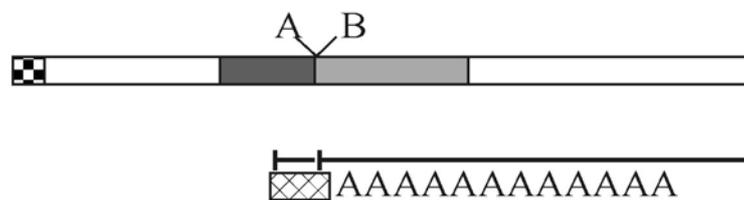
Duplikationen viraler Sequenzen oder verschiedener Deletionen, alle auch LC3 kodierende Sequenzen. Alle analysierten Genome besitzen eine gemeinsame, konservierte Grundstruktur. Diese ist charakterisiert durch eine LC3 kodierende Insertion mit immer gleichem 3'-Ende, auf das das exakte 5'-Ende des NS3-Gens und die Gene für NS4A-NS5B sowie die 3' NTR folgen. Mit Ausnahme eines Falles ist auch das 5'-Ende der LC3-Insertion und das 3'-Ende eines davor lokalisierten Fragments des NS2-Gens konserviert. Unterschiede in der Genomstruktur der verschiedenen zp Isolate entstehen dadurch, dass das 5'-Ende des NS2 kodierenden Fragments variiert und weiter stromauf davon unterschiedlich große Duplikationen oder Deletionen viraler Sequenzen zu finden sind. Das Auftreten konservierter Sequenzübergänge zwischen den flankierenden Sequenzduplikationen, die für NS2 und NS3 kodieren, und der LC3 kodierenden Sequenz kann so interpretiert werden, dass die verschiedenen Rekombinanten einen gemeinsamen Ursprung haben. So könnte im persistent mit JaNCP infizierten Tier durch Rekombination ein zp Primär genom generiert worden sein, bei dem die LC3-Insertion genau zwischen NS2 und dem NS3 Gen integriert worden war, aber keine Duplikation oder Deletion entstanden war. Durch weitere Rekombinationen könnte daraus eine ganze Reihe sekundärer zp BVD-Viren entstanden sein. Hintergrund für diese Überlegung ist, dass die Entstehung vieler Rekombinanten mit gleichen Übergängen zwischen viraler Sequenz und LC3 Insertion extrem unwahrscheinlich ist. Nach gängiger Vorstellung erfolgt die Rekombination bei positiv Strang RNA Viren durch einen Matrzensprung der viralen RNA-Polymerase während der Replikation. Dieses sogenannte „template switch“-Modell beinhaltet, dass während der RNA-Rekombination die RNA-Polymerase vom Template abspringt, auf eine neue Matrize (zellulär oder viral) wechselt und die RNA-Synthese fortsetzt (Kirkegard und Baltimore, 1986; Meyers und Thiel, 1996). Die Rekombination muss während der Negativstrangsynthese erfolgen, da die zelluläre Matrize (LC3 kodierende mRNA) nur in der kodierenden Orientierung vorliegt. Um das JaCP-Genom entsprechend diesem Mechanismus zu erklären, sind drei Matrzensprünge der viralen RNA-Polymerase notwendig. Vorstellbar wäre, dass bei der Negativstrangsynthese der Primärmutante die RNA-Polymerase am 5'-Ende des NS3 Gens auf die LC3 kodierende mRNA wechselt (1. Matrizenwechsel), nach Transkription in einem 2. Matrizenwechsel an das Ende der NS2 kodierenden Sequenz springt, und anschließend das Genom bis zum 5'-Ende vollständig abliest. Damit würde eine Primärrekombinante erzeugt, die die LC3-Insertion zwischen NS2- und NS3-Gen inseriert hat. Diese Primärrekombinante wäre zumindest als Replikon zur autonomen Replikation fähig (s.u.) und könnte so vermehrt werden. In weiteren

variablen Polymerasesprüngen könnten während der Replikation der Primärrekombinante (3. Matrizenwechsel) virale Duplikationen eingeführt werden (Abb. 16).

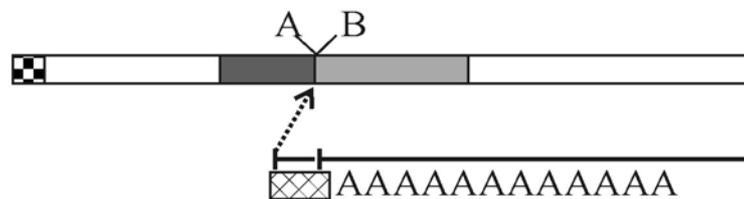
1. Matrizenwechsel zur zellulären mRNA



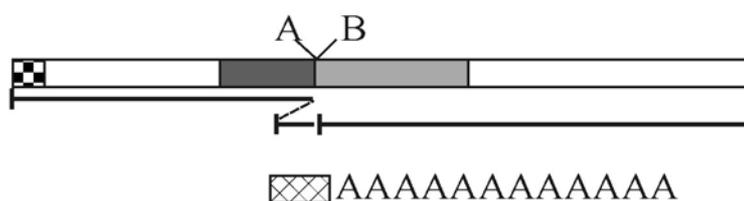
2. Kopie der zellulären Sequenz



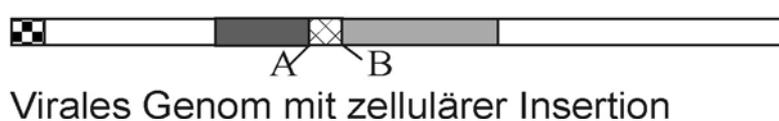
3. Matrizenwechsel zur viralen RNA



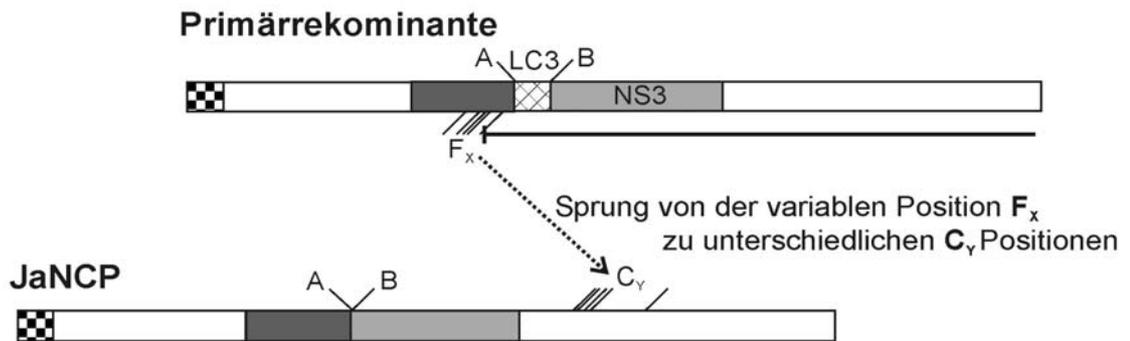
4. Abschluss der Synthese viraler RNA



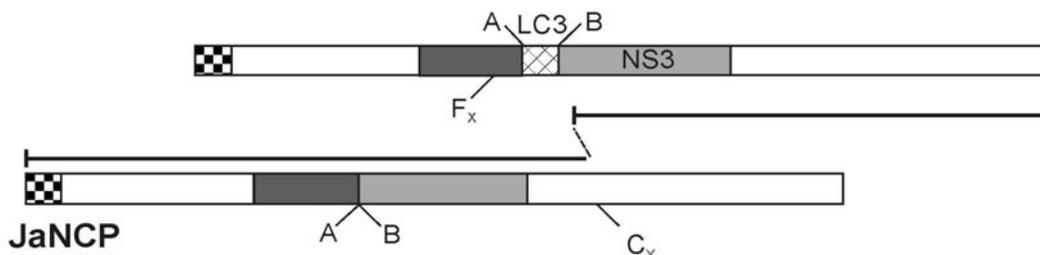
5. Primärrekombinante



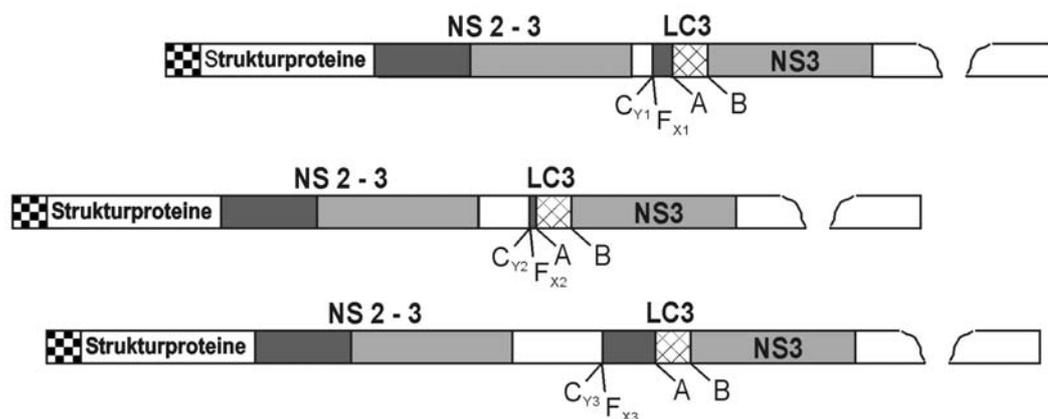
6. Matrizenwechsel von viraler RNA zu viraler RNA



7. Abschluss der Synthese viraler RNA



8. Eine Reihe von sekundären Rekombinanten

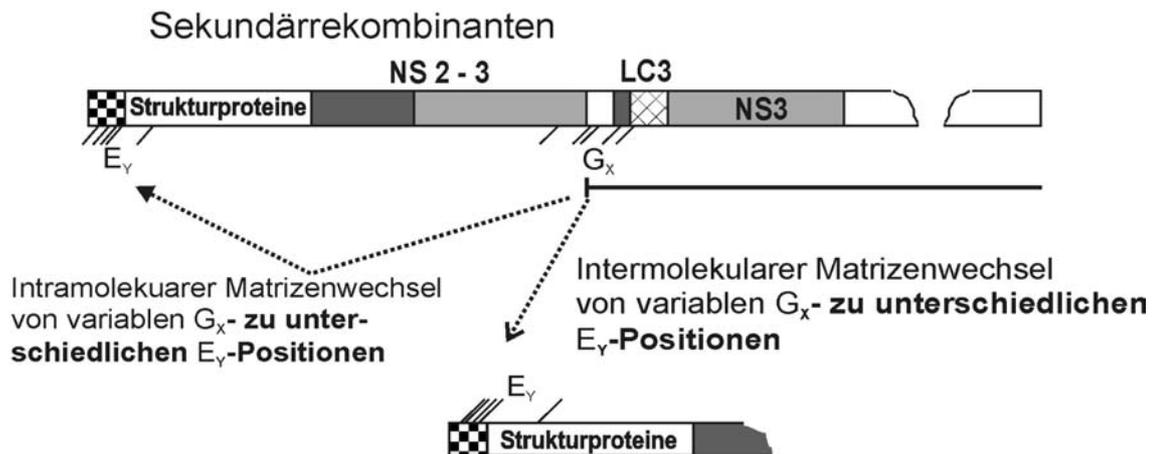


Genome autonom replikationsfähiger zp Viren mit unterschiedlichen Duplikationen

Abb. 16: Schematische Darstellung eines Stufenmechanismus für die Generierung vieler ähnlicher Rekombinanten. RNAs in kodierender Orientierung sind als Balken dargestellt, während neu synthetisierter negativ-Strang RNA als schwarze Linien gezeigt sind. Die Pfeile zeigen die Matrizenwechsel an. Durch 2 Matrizenwechsel wird die vermutete Primärrekombinante generiert (Schritte 1.-5.). Die Einführung unterschiedlich flankierender Duplikationen erfolgt durch den 3. Matrizenwechsel (Schritte 6.-8.).

Während der Replikation dieser Sekundärrekombinanten könnten dann entweder durch intramolekulare oder intermolekulare Polymerasesprünge (4. Matrizenwechsel) Deletionen in die Genome einer Reihe von tertiären Rekombinanten eingeführt werden (Abb. 17).

Matrizenwechsel von viraler zu viraler RNA



Eine Reihe von Tertiärrekombinanten mit Deletionen

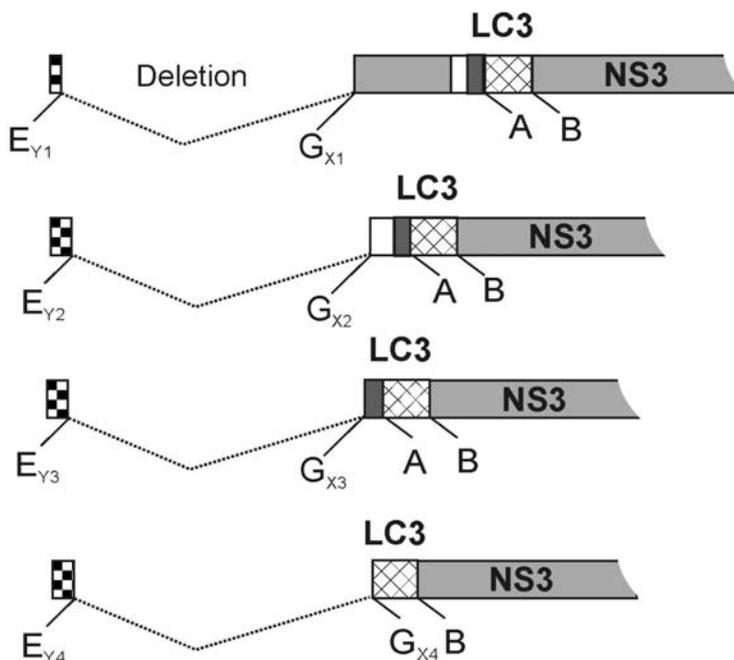


Abb. 17: Schematische Darstellung des Modells, das die Entstehung defekter Viren beschreibt. Ausgehend von einer sekundären Rekombinationsmutante wird während der Genomreplikation (hier dargestellt bei der negativ-Strang Synthese), durch einen weiteren Matrizenwechsel (4. Wechsel) eine Deletion in das Genom eingeführt. Hierbei sind zwei Rekombinationsmechanismen, basierend auf einem inter- bzw. intramolekularem Matrizenwechsel dargestellt. Kodierende RNAs sind als Balken dargestellt, schwarze Linien repräsentieren neu synthetisierte negativ-Strang RNA. Matrizenwechsel werden durch Pfeile angezeigt.

Dieser Ablauf würde die gemeinsame Genomstruktur der rekombinierten Genome erklären und wäre weniger unwahrscheinlich als andere mögliche Modelle. Allerdings wurde die vorgeschlagene Genomstruktur der primären Rekombinante nicht nachgewiesen. Alternativ könnte natürlich auch in 3 Matrizenwechseln direkt eine Primärrekombinante mit grosser Duplikation entstanden sein, die dann in weiteren Rekombinationen auf unterschiedliche Art verkürzt wurde. Hiergegen spricht allerdings die nochmals höhere Unwahrscheinlichkeit von drei Rekombinationsereignissen in nur einem Replikationszyklus. Theoretisch besteht auch noch die Möglichkeit, dass die einzelnen Rekombinanten in völlig separaten Rekombinationsereignissen, also nicht aus einer Primärrekombinante, entstanden sind. Voraussetzung für die Konservierung der Übergangsstellen zwischen viraler und LC3 kodierender Sequenz wäre dann aber, dass die entsprechenden Sequenzen für die Rekombination prädestiniert wären. Solche „hot spots“ können bei der RNA-Rekombination entstehen, wenn die neu synthetisierte RNA und die Matrize, zu der der Wechsel erfolgt, in Teilen komplementär sind, so dass eine Hybridisierung möglich ist. Die unterschiedliche Struktur der Rekombinationsstellen bei den von Jasper isolierten Rekombinanten erlauben aber nicht die Annahme, dass spezifische Rekombinationssequenzen die Position der Übergänge bestimmen.

Die Untersuchung einer klonierten primären Rekombinante ohne virale Duplikation, jedoch mit der LC3 kodierenden Sequenz in der konservierten Position, zeigte, dass zwar als Replikon fungiert, aber sie ohne Helfervirus keine infektiösen Virusnachkommen generieren kann (Meyers et al., 1998). Denkbar wäre deshalb, dass eine primäre Rekombinante ohne Duplikation mit Hilfe eines Helfervirus repliziert wurde und durch weitere Rekombinationen Vorteile erreicht werden konnten, da damit die autonome Replikationsfähigkeit möglich war. Aus den angenommenen primären bzw. sekundären Rekombinante(n) entstanden entweder durch einen intramolekulären oder intermolekularen 4. Matrizenwechsel Deletionsmutanten wie z.B. JaC8.3. Für die Jasper-Klone JaC6.1, JaC6.2 und JaB8.1 wäre allerdings auch aufgrund des Fehlens eines duplizierten NS2-Fragments ein Rekombinationsmodell vorstellbar, das lediglich aus den Rekombinationsschritten 1. und 2. besteht. Die LC3-Insertion der letztgenannten Rekombinante war gegenüber der bei JaCP gefundenen Insertion um das 5' terminale Kodon verkürzt. Bei allen anderen analysierten Rekombinanten wurde ein zum JaCP exakt identischer LC3 kodierender Sequenzanteil gefunden. Dies lässt auf eine funktionelle Notwendigkeit der Integrität der LC3-Insertion für den Mechanismus der Polyproteinprozessierung der zp Viren schließen. Die Notwendigkeit eines vollständigen LC3 für die Spaltung konnte folgerichtig auch experimentell demonstriert werden.

Eine auffällige Eigenschaft fast aller bisher untersuchten zp BVD-Viren ist, dass der Aminoterminus des in Folge der Genomveränderung erzeugten NS3 exakt gleich ist. Das NS3 beginnt mit der Aminosäuresequenz G P A V C K K (Meyers und Thiel 1996; Kümmerer et al., 2000). Dies ist bemerkenswert, da die Freisetzung des NS3 durch sehr unterschiedliche Mutationen bedingt wird. Genau diese Sequenz entsteht auch nach Prozessierung des JaCP Polyproteins (Meyers et al., 1998). Damit induziert die LC3-Insertion die proteolytische Spaltung exakt am eigenen C-Terminus.

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, dient das LC3 im viralen Polyprotein als Angriffspunkt einer zellulären Protease, die nach dem carboxyterminalen Glycin der LC3-Insertion das Polyprotein spaltet. Die eigentliche Aufgabe dieser Protease ist die Prozessierung eines LC3-Vorläuferproteins, was nach heutigem Kenntnisstand für die Funktion des LC3 essentiell ist. LC3 wurde zuerst als 16,4 kD großer Bestandteil von Mikrotubuli assoziierten Proteinen (MAP1 und MAP2) entdeckt (Mann und Hammarback, 1994). Durch die carboxyterminale Prozessierung von LC3 nach dem konservierten Glycin (AS# 120 bei bovinem LC3) wird die aktivierte LC3-I Form generiert, die dann in die membrangebundene Form LC3-II umgewandelt wird, die auf der Oberfläche von Autophagosomen detektiert werden kann (Kabeya et al., 2000). Autophagosomen entstehen unter Hungerbedingungen während der Autophagozytose und regeln das Recycling zytosolischer Proteine, indem sie mit Vakuolen fusionieren, um dort proteolytisch abgebaut zu werden. Die Beteiligung von LC3 an der Autophagozytose konnte zuerst durch Analogieschluss zum homologen Hefeprotein Aut7p/Apg8 nahegelegt werden. Im Zytosol von Δ Aut7 Hefestämmen bilden sich unter Hungerbedingungen Vesikel, die schmäler als normale Autophagosomen sind (Lang et al., 1998). Autophagosomen entstehen an der PAS („preautophagosomal structure“), und neuere Studien haben gezeigt, dass sie sich unter Einlagerung von Aut7p/Apg8p in die Membran dieser subzellulären Struktur formen (Suzuki et al., 2001). Voraussetzung dazu ist, dass es durch das Aut7p/Apg8p-Konjugationssystem, ein Ubiquitin ähnliches System, das durch proteolytische Spaltung aktivierte carboxyterminale Glycin des LC3 an die Aminogruppe von Phosphatidylethanolamin (PE) kovalent gebunden und danach in die Membran des PAS eingelagert wird (Ichimura et al., 2000; Kirisako et al., 2000; Noda et al., 2002). Es ist anzunehmen, dass LC3 eine ähnliche Funktion wie Aut7p/Apg8p besitzt und deshalb ebenfalls nach proteolytischer Aktivierung mit einem Phosphoglycerolipid konjugiert wird. Eine in diesem Zusammenhang entscheidende Frage war, welche Protease für die Prozessierung am Carboxyterminus des LC3 im viralen Polyprotein bzw. beim Vorläufer LC3 verantwortlich ist. Durch *in vitro*-Translationsversuche

in RRL unter Verwendung von Proteaseinhibitoren konnte unter einer Vielzahl von möglichen Proteasetypen der Typus „Cysteinprotease“ eingegrenzt werden. Die Ansätze zur Identifizierung der fraglichen Protease wurden während der Arbeit durch die Publikation von Daten beeinflusst, welche die Protease Aut2p/Apg4p als das Enzym in Hefe identifizierten, das Aut7p/Apg8p spaltet. Basierend auf Sequenzvergleichsstudien konnten zwei unterschiedliche humane Aut2-homologe Sequenzen HsApg4A und HsApg4B identifiziert werden (Kirisako et al., 2000). Diese Informationen dienten in der vorliegenden Arbeit dazu, zum ersten Mal drei bovine Sequenzen mit hoher Homologie zu den humanen Analogen zu identifizieren. Ebenfalls konnte eine Sequenz aus Hühnerzellen detektiert werden, die homolog zur humanen Sequenz HsApg4B ist.

In Entsprechung zum Hefehomolog Aut7p/Apg8p sollte für LC3 die Prozessierung durch eine der von den klonierten Sequenzen kodierten potentiellen Proteasen gezeigt werden. Die zuerst durchgeführten Experimente dienten der Suche nach einem Testsystem zur funktionellen Überprüfung der Proteasekandidaten. Hierbei stellte sich heraus, dass alle getesteten Systeme, auch phylogenetisch entfernte Zellsysteme, die von Huhn, Fisch oder Insekten stammten, die intrinsische Aktivität besitzen, LC3 zu prozessieren. Dieses Ergebnis deutet bereits auf die strenge Konservierung des LC3-Prozessierungssystems hin. Diese Konservierung zeigte sich auch darin, dass 3 der Proteasekandidaten einen Aut2-Defekt in Hefe komplementieren, also offensichtlich die analoge Hefeprotease ersetzen können. Durch Komplementationsversuche in Δ Aut2-Hefen konnte gezeigt werden, dass zwei der drei bovinen Proteasekandidaten, bAut2B2 und bAut2A, sowie cAut2B, in der Lage waren, den Defekt der Reifung von prAPI zu mAPI zu beheben, was ein sicheres Merkmal von Autophagozytose kompetenten Hefezellen darstellt. Ähnliches wurde bereits für 2 unterschiedliche Sequenzen von *Drosophila* gezeigt (Thumm und Kadowaki, 2001).

Die oben beschriebene Untersuchung zeigte, dass bAut2B2, bAut2A und cAut2B die Funktion der Autophagozytose bei Hefe unterstützen, nicht jedoch, ob sie an der aktivierenden Spaltung von LC3 bei höheren Eukaryonten beteiligt sind. Die Frage, ob eine der identifizierten möglichen Proteasen LC3 spaltet, wurde durch Analysen in Aut2 defizienten Hefestämmen weiter bearbeitet. Durch Koexpression eines NS2/LC3/NS3-Polyproteinfragmentes zusammen mit dem jeweiligen Proteasekandidaten konnte in diesem Testsystem ermittelt werden, dass bAut2B2 und cAut2B in der Lage waren, LC3 zu spalten, während für bAut2B1 und bAut2A keine Spaltung gezeigt werden konnte. Die fehlende Spaltung bei bAut2B1 könnte auf Instabilität oder zu geringe Expression des Proteins zurückzuführen sein, denn bAut2B1 war im Gegensatz zu den anderen Proteasekandidaten

nach Expression in Hefe nicht nachweisbar, obwohl das Antiserum B ein konserviertes Peptid epitop der Proteasen bAut2B1 und bAut2B2 erkennt und in einem anderen Versuch auch mit bAut2B1 reagierte. Festzuhalten bleibt, dass die Koexpressionsversuche in Hefe gezeigt haben, dass bAut2B2 und cAut2B Säuger-LC3 spalten können.

Während nach *in vitro*-Translation in RRL eine intrinsische Aktivität des Lysats LC3 enthaltendes Polyprotein spaltet, zeigten *in vitro*-Translationsversuche mit Pflanzenextrakten (WG) keine Spaltung des Polyproteins. Die folgenden Koexpressionsversuche mit den Proteasekandidaten in WG zeigten, dass bAut2B2 und cAut2B wiederum in der Lage waren, das Polyprotein zu spalten. Dagegen fand die Prozessierung bei Anwesenheit von bAut2A und bAut2B1 nicht statt, obwohl diese Proteine eine Homologie zu bAut2B2 zeigen. Identische Untersuchungen mit bovinem LC3-Vorläuferprotein zeigten das gleiche Ergebnis. In diesem System waren alle Proteasekandidaten nachweisbar, so dass angenommen werden muss, dass bAut2B1 das Säugersubstrat LC3 nicht spaltet. Der Prozessierungsmechanismus für das virale Polyprotein an der durch LC3 zusätzlich eingeführten Spaltstelle konnte damit als aufgeklärt angesehen werden: Die Spaltung wird durch die zelluläre bAut2B2 Protease durchgeführt, deren primäre Funktion die Prozessierung des LC3 Vorläuferproteins ist.

Eine weiterhin offene Frage ist, warum in Säugetier- und Insektenzellen mehr als eine Aut2p/Apg4p homologe Protease exprimiert wird. In diesem Zusammenhang muss festgestellt werden, dass Säugetierzellen 2 weitere LC3 homologe Proteasen besitzen, zum einen das 16 kD große GATE-16 („golgi-associated ATPase Enhancer“), und zum anderen GABARAP („ γ -aminobutyric acid A receptor-associated protein“) (Lang et al., 1998). Für GATE-16 konnte zunächst ein modulierender Einfluss innerhalb des konstitutiven sekretorischen Wegs gezeigt werden (Legesse-Miller et al., 1998; Sagiv et al., 2000). Es ist im Golgi-Apparat lokalisiert, wo es mit weiteren Proteinen am Vesikeltransport mit wahrscheinlicher Unterstützung der Membranfusion beteiligt ist. Interessanterweise scheint Aut7p/Apg8p das funktionelle Homolog von GATE-16 in Hefe zu sein, da es GATE 16 in *in vitro*-System des intra-Golgi-Transportes ersetzen kann (Legesse-Miller et al., 2000). Für GABARAP wurde hingegen vorgeschlagen, dass es beiteiligt ist an der Verankerung von Rezeptoren durch seine Fähigkeit, mit Mikrotubuli und Mikrofilamenten zu interagieren (Wang und Olsen, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass beide Proteine an einem konservierten Glycin das dem Gly #120 des LC3 entspricht, prozessiert werden (Tanida et al., 2003). Die carboxyterminale Prozessierung von GATE-16 konnte *in vitro* durch bakteriell exprimiertes HsApg4A, das humane Homolog zu bAut2A, gezeigt werden (Scherz-Shouval et al., 2003). Es ist anzunehmen, dass es sich bei den Säugetierhomologen von Aut7p/Apg8p

und Aut2p/Apg4p im Gegensatz zum Hefesystem um ein komplexes System handelt. Bekräftigt wird dies durch die kürzliche Identifizierung von 2 zusätzlichen Aut2p/Apg4p homologen Sequenzen in Mäuse- und Menschenzellen, wovon eine in der Lage war, den Aut2-Defekt in Hefe zu komplementieren (Marino et al., 2002). Möglich wäre allerdings, dass auch LC3 durch eine dieser Proteasen gespalten wird, und dass somit Proteasen mit gleicher oder ähnlicher Funktion existieren könnten. Es sollte aber auch bedacht werden, dass LC3 wie Aut7p/Apg8p nach kovalenter Bindung wieder dekonjugiert werden muss und dass einem oder mehreren der Proteasekandidaten diese Aufgabe zukäme, die in der Hefe ebenfalls durch Aut2p/Apg4p erledigt wird (Kirisako et al., 2000).

Ein interessanter Befund der durchgeführten Analysen ist die Fähigkeit der Proteasen bAut2B2, cAut2B und bAut2A, den Defekt der Autophagozytose in Aut2 Δ Hefe zu komplementieren. Dieses Ergebnis ist nach heutigem Kenntnisstand nur dadurch zu erklären, dass alle 3 Proteasen in der Lage sind, Aut7p/Apg8p zu spalten, während nur bAut2B2 und cAut2B LC3 spalten. Damit ist die Flexibilität der Interaktion über die Speziesgrenzen hinweg offenbar größer als innerhalb einer Spezies, wenn vorausgesetzt wird, dass alle in Säugern gefundenen Proteasekandidaten ausser bAut2B2 nicht in der Lage sind, LC3 zu spalten.

Die Frage, ob Aut2p/Apg4p auch in der Lage ist, Säuger-LC3 zu spalten konnte letztlich nicht eindeutig geklärt werden, da zwar in Wildtyphefe die Spaltung von Säugersubstrat durch Aut2p/Apg4p gezeigt werden konnte, es jedoch ebenso Anzeichen gab, dass in Aut2 Δ Hefen LC3 mit schwacher Effizienz gespalten wurde. Die resultierenden Ergebnisse konnten nie ausreichend konsistent reproduziert werden, legen jedoch die Hypothese nahe, dass auch in Hefe weitere Proteasen vorhanden sein könnten, die Säuger-LC3 unspezifisch spalten.

Eine mögliche Erklärung für die Austauschbarkeit der Proteasen zwischen den Spezies ist die beobachtete Aminosäurehomologie der Substrate besonders, die Übereinstimmung im Bereich der Spaltstelle. Beide Substrate, Aut7p/Apg8p und das virale Polyprotein werden nach dem konservierten caroxyterminalen Aminosäuremotiv T F G gespalten (Meyers et al., 1998; Kirisako et al., 2000). Die Veränderung dieses Motivs und der folgenden NS3 kodierenden Sequenz sollte die Frage nach dem Einfluss dieser Sequenz auf die Spaltung des Polyproteins klären. Punktmutationen im NS3 kodierenden Anteil der Spaltstelle führten zu einer geringen Veränderung der Freisetzung von NS3. Der Austausch von Gly nach Val an Position P1' reduzierte die Spaltung auf 65 %, was an der Größe oder der Hydrophobizität der Seitenkette liegen könnte. Durch Einführung von Punktmutationen wurden einzelne Aminosäuren innerhalb der des T F G-Motivs ausgetauscht. Austausche an P3 lassen keinen

Einfluss auf die Spaltung erkennen, Veränderungen an Position P1 und P2 hatten dagegen eine massive Reduzierung der Freisetzung von NS3 zur Folge. Die Reduzierung der Spaltung war im Wesentlichen an die Veränderung dieser beiden Positionen gebunden und folgte keinem ersichtlichen Gesetz in Bezug auf Art und Größe der dort eingeführten Aminosäure. Die minimalste Spaltung betrug 10 % bei einem Austausch von Phe nach Arg an P2 und 13,7 % bei einem Austausch von Gly nach Phe an Position P1. Da die Prozessierung bei einem Austausch nie null wurde, muss davon ausgegangen werden, dass die Spaltung nicht ausschließlich von dem T F G Motiv abhängt, sondern von der Bindungsspezifität zwischen LC3-Protein und Protease und der damit verbundenen induzierten Passform. Das LC3-Protein darf aminoterminal maximal um 21 Aminosäuren verkürzt werden, bevor der vollständige Verlust der Spaltung eintritt; carboxyterminale Verkürzungen bewirken immer den Verlust der Spaltbarkeit. Interessant ist unter diesem Gesichtspunkt, dass LC3 trotz der umgebenden viralen Proteine im Polyprotein gespalten wird, wenn auch schwächer als das zelluläre LC3.

Die Konservierung der LC3-Insertion in den verschiedenen Isolaten deutet auf eine wichtige Funktion der Sequenz des Inserts hin. Punktmutationen, die zu einer unterschiedlichen Freisetzung von NS3 führen würden, könnten die Bildung von Replikationsstrukturen negativ beeinflussen (Egger et al., 2002), da für die Replikation ein ausbalancierter molarer Gehalt der Prozessierungsprodukte NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B mit der Fähigkeit zur Replikation bei Replikons korreliert (Grassmann et al., 2001). Ebenso wäre es interessant zu untersuchen, wie sich unterschiedlich effiziente Freisetzung von NS3 auf den zytopathogenen Effekt auswirkt. Aus Untersuchungen zu einem anderen zp BVDV Stamm gibt es bereits Hinweise, dass tatsächlich ein Zusammenhang zwischen der Menge des gebildeten NS3 und der Zytopathogenität und Lebensfähigkeit der Viren gibt (Kümmerer und Meyers, 2000). Es ist andererseits auch bemerkenswert, dass beim CSFV NS3 in geringerer Menge exprimiert wird, die Viren aber einen nzp Phänotyp aufweisen.

Die Freisetzung von NS3 ist bei BVDV nur in Zellen detektierbar, die mit zp Viren infiziert wurden. Die Expression von NS3 ist damit das spezifische Markerprotein für zp Viren des BVDV Systems (Meyers und Thiel, 1996; Kümmerer et al., 2000). Ob jedoch die Expression und Akkumulation von NS3 den toxischen Effekt auslöst und MD induziert, ist unbekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass zp BVD-Viren in der Lage sind, ER-Stress durch den Verlust an Ca^{2+} zu induzieren, wodurch die ER-transmembran-Kinase („PKR-like kinase“) aktiviert wird, die den Translationsinitiationsfaktor eIF2 alpha hyperphosphoryliert. Die ER-Stress-Antwort induziert die Caspase 12 Expression, reguliert das antiapoptotische Protein

Bcl-2 nach unten und löst Apoptose aus (Jordan et al., 2002). Ob NS3, ein bestimmtes anderes virales Protein, eine Kombination der im ER vorhandenen Proteine, oder ein bestimmtes molares Verhältnis von viralen Proteinen ER-Stress auslöst, ist nicht untersucht. Ebenso unklar ist, warum nzp BVD-Viren keine Apoptose auslösen. Die Frage, ob der Zelltod durch Apoptose oder einem nekrotischen Effekt ausgelöst wird, oder aber durch eine Vielzahl unterschiedlicher Effekte (multifunktionales Zellversagen) wie z.B. zusätzlicher Verlust der Proteinsynthese ist zu klären.

Entscheidend für die Entwicklung von MD ist die Generierung eines zp Virus wie JaCP in einem Tier, das persistent mit einem nzp Virus infiziert ist. Das zp Virus wird in vielen Fällen durch Mutation des nzp Virus im infizierten Tier erzeugt (Meyers und Thiel, 1996). Vor Ausbruch von MD konnte durch Sequenzanalysen viraler RNA aus dem Serum persistent infizierter Kälber gezeigt werden, dass eine große Anzahl von unterschiedlichen rekombinanten viralen Sequenzen innerhalb der Tiere präsent waren (Desport et al., 1998). Für den Verlauf der Entwicklung von MD wurde deshalb ein lineares Modell vorgeschlagen. In diesem Modell repliziert zuerst das nzp Virus im persistent infizierten Tier. Während der Replikation kommt es zu einer Vielzahl von Rekombinationsereignissen sowohl mit zellulärer als auch mit viraler RNA. Die daraus resultierenden Genome werden in der Mehrzahl defekt sein, und nur ein geringer Anteil wird in der Lage sein, autonom oder in Anwesenheit des schon vorher vorhandenen nzp Virus in der Funktion eines Helfervirus zu replizieren. Nur selten entsteht ein zp Virus mit Replikationsvorteil. Dieses zp Virus wird ausselektiert und induziert nach einer bestimmten Phase der Replikation MD, die zum Tod des Tieres führt. Das lineare Modell folgt so dem Prinzip, dass während einer großen Zahl von Rekombinationsereignisse ein zp Virus gebildet wird, das sich aufgrund eines Selektionsvorteils durchsetzt und zusammen mit dem nzp das Viruspaar bildet. Für das Tier Jasper ist ein anderes Modell denkbar. Die RT-PCR-Ergebnisse von unterschiedlichen Serenproben von Jasper zeigten im Vergleich zu Negativkontrollen, dass ein Jahr vor Ausbruch von MD rekombinante RNA detektiert wurde, die identisch ist mit Teilen der NS3- und LC3-Sequenz des JaCP Genoms bzw. mit anderen LC3-Rekombinanten, die nach Ausbruch der MD isoliert wurden. Eine Verunreinigung der Proben im Labor der Serumnahme (Irland) kann ausgeschlossen werden, da sowohl zum Zeitpunkt der Probennahme als auch zu späteren Zeitpunkten weder ein Virus mit einer LC3-Insertion vorhanden sein konnte, noch Untersuchungen mit den Seren durchgeführt wurden. Für sechs weitere Serumproben (21.12.1987 bis 23.10.1989) konnte das Vorhandensein dieser rekombinanten RNA schon bereits über zwei Jahren vor Ausbruch der MD nachgewiesen

werden. Diese Proben ergaben konsistent positive Ergebnisse, was an der Tatsache liegen mag, dass das jeweilige Volumen der einzelnen Serenproben wesentlich größer und die Seren nicht, wie die zuvor beschriebenen, durch Hitze (1 h 56 °C) inaktiviert worden waren. Auch wenn aufgrund der fehlenden Negativkontrolle diese Analysen nur bedingt ausgewertet werden können, deuten sie daraufhin, dass eine LC3-haltige Primärrekombinante möglicherweise schon zwei Jahre vor Auftreten der ersten MD Krankheitssymptome gebildet worden war. Ob es sich bei diesen früh nachzuweisenden NS3/LC3 kodierenden rekombinanten RNA-Fragmenten um das Genom der bereits erwähnten Primärrekombinante handelt, ist mit dem verwendeten Analysesystem nicht definitiv nachweisbar. Dieses Problem betrifft auch die Serenproben, die nach Ausbruch von MD genommen wurden, so dass die Existenz dieser Primärrekombinante zwar aus den erhaltenen Daten nahegelegt werden kann, aber nicht beweisbar ist. Es bleibt aber festzuhalten, dass das Vorhandensein von gut nachweisbaren Mengen an rekombinanter BVDV-RNA mit LC3-Insertion nicht zur schnellen Entwicklung von MD führte, sondern das Tier vermutlich noch Jahre überlebte, ohne dass MD ausbrach. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Replikationsfähigkeit der primären Rekombinante nicht ausreichend war oder dieses Virus einen anderen entscheidenden Nachteil besaß. In diesem Zusammenhang ist wichtig, dass eine künstlich hergestellte Rekombinante, die die wahrscheinliche Genomstruktur der primären Rekombinante nachahmt, nur bei Anwesenheit eines Helfervirus replizierte und den zytophatogenen Effekt induzierte (Meyers et al., 1998). Aus dieser rekonstruierten Primärrekombinante lassen sich die Genome aller sekundären Rekombinaten wie z.B. JaCP ableiten. Im Gegensatz zum linearen Modell geht das hier entworfene Modell also von einem Stufenprozess aus. In der ersten Stufe wurde eine primäre Rekombinante gebildet. Diese replizierte schwach und benötigte ein Helfervirus. Durch weitere Rekombinationsschritte entstand ein „Pool“ von zp Viren, von denen viele in der Lage waren, effizient und autonom zu replizieren, so dass sie gegenüber der Primärrekombinanten einen entscheidenden Replikationsvorteil besaßen. Dieser „Pool“ von zp Viren oder einzelne Rekombinanten aus diesem Pool induzierten nach einer bestimmten Phase der Replikation MD, die zum Tod des Tieres führte.

Wichtig bei zukünftigen Analysen von Genomstrukturen von Viren, die MD verursachten, ist die Überprüfung der Anwesenheit verschiedener zp Viren und damit die Frage, ob die Krankheitsentwicklung dem linearen oder dem Stufenmodell folgt. Dazu wird es nötig sein auch in anderen Fällen den zeitlichen Verlauf der MD Entwicklung zu rekonstruieren.

Festzuhalten bleibt, dass die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse völlig neue und überraschende Erkenntnisse zur Entwicklung der MD erbracht haben. Die

Aufklärung der LC3 unterstützten Polyproteinprozessierung hat zudem einen wichtigen Beitrag zur Erforschung von LC3 abhängigen zellbiologischen Vorgängen ergeben und einmal mehr gezeigt, wie Viren den Stoffwechsel ihrer Wirtszellen für eigene Zwecke ausnützen.

5 Zusammenfassung

BVDV ist dafür bekannt, dass zytopathogene Virusvarianten durch Integration zellulärer Sequenzen in das virale RNA-Genom entstehen. Die zellulären Insertionen induzieren nach Translation eine zusätzliche Spaltung des viralen Polyproteins. In der vorliegenden Arbeit wurden die Genome von verschiedenen BVDV Isolaten charakterisiert, die alle aus einem erkrankten Tier stammen. Analysen von cDNA-Klonen und RT-PCR Fragmenten erlaubten es, die Genomstrukturen einer Reihe von Viren zu rekonstruieren. Alle enthielten die gleiche zelluläre Sequenz, flankiert von unterschiedlich rearrangierten viralen Sequenzen. Die gefundenen Genomstrukturen lassen sich auf eine Grundstruktur zurückführen. Da die Entstehung solcher Virusvarianten mit weitgehend übereinstimmenden Genomstrukturen in unabhängigen Rekombinationsereignissen unwahrscheinlich ist, deuten diese Ergebnisse auf einen evolutionären Prozess hin, in dem eine Primärrekombinante gebildet und anschließend durch weitere Rekombinationen verändert wurde.

Bei der zellulären Insertion handelt es sich um ein Fragment des LC3 („light chain 3“), einem Bestandteil von Mikrotubuli assoziierten Proteinen. Aufgrund früherer Befunde war zu erwarten, dass das LC3 im viralen Polyprotein als Signal für eine proteolytische Prozessierung dient. Dies konnte in proteinbiochemischen Analysen bestätigt werden. Mutageneseexperimente erlaubten die Charakterisierung der Spaltstelle, die direkt am carboxyterminalen Ende der zellulären Insertion lokalisiert ist. In *in vitro*-Translationsstudien mit verschiedenen Proteaseinhibitoren konnte zudem gezeigt werden, dass es sich bei der prozessierenden Protease vermutlich um eine Cysteinprotease handelt. Expressionen in Zellen verschiedener Spezies zeigten, dass das prozessierende System außergewöhnlich gut konserviert ist, denn in Zellen von Hamster, Huhn, Fisch und Moskito wurde das bovine Substrat offensichtlich authentisch gespalten. LC3 bzw. das homologe Protein Aut7p/Apg8p der Hefe besitzen wesentliche Funktionen bei der Autophagie von hungernden Zellen. LC3 und Aut7p/Apg8p werden dazu durch carboxyterminale Proteasespaltung aktiviert. Nach Klonierung verschiedener potentieller Proteasegene aus Rinderzellen konnte durch *in vitro*-Kotranslationen und Expressions-Experimente in Hefezellen gezeigt werden, dass eine der potentiellen Proteasen tatsächlich LC3 prozessiert. Die Expression dieser und einer weiteren potentiellen Rinderprotease in Hefezellmutanten konnte eine Mutation, die zum Verlust der spezifischen Hefeprotease Aut2p/Apg4p führte, komplementieren. Die vorliegende Arbeit hat damit wichtige Erkenntnisse sowohl über die Grundlagen der Zytopathogenität von BVDV

und die Entwicklung der MD als auch über ein hochkonserviertes zelluläres Protein-Prozessierungssystem erbracht.

6 Literaturverzeichnis

- Agol, V. (1997). Recombination and other genomic rearrangements in picornaviruses. *Semin. Virol.* **8**, 77-84.
- Baba, M., Ohsumi, M., Scott, S.V., Klionsky, D.J., and Ohsumi, Y. (1997). Two distinct pathways for targeting proteins from the cytoplasm to the vacuole/lysosome. *J. Cell Biol.* **139**, 1687-1695.
- Baker, J.C. (1987). Bovine viral diarrhea virus: a review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **190**, 1449-1458.
- Baroth, M., Orlich, M., Thiel, H.-J., and Becher, P. (2000). Insertion of cellular NEDD8 coding sequences in a pestivirus. *Virology* **278**, 456-466.
- Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979). Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- Becher, P., Orlich, M., König, M., and Thiel, H.-J. (1999). Nonhomologous RNA recombination in bovine viral diarrhea virus: Molecular characterization of a variety of subgenomic RNAs isolated during an outbreak of fatal mucosal disease. *J. Virol.* **73**, 5646-5653.
- Behrens, S.-E., Tomei, L., and De Francesco, R. (1996). Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J.* **15**, 1439-1448.
- Behrens, S.-E., Grassmann, C.W., Thiel, H.-J., Meyers, G., and Tautz, N. (1998). Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon. *J. Virol.* **72**, 2364-2372.
- Bolin, S.R., McClurkin, A.W., Cutlip, R.C., and Coria, M.F. (1985). 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**, 573-576.
- Bredenbeek, P.J., Frolov, I., Rice, C.M., and Schlesinger, S. (1993). Sindbis virus expression vectors: packaging of RNA replicons by using defective helper RNAs. *J. Virol.* **67**, 6439-6446.
- Brownlie, J., Clarke, M.C., and Howard, C.J. (1984). Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Vet. Rec.* **114**, 535-536.
- Bujarski, J.J., Nagy, P.D., and Flasiniski, S. (1994). Molecular studies of genetic RNA-RNA recombination in brome mosaic virus. *Adv. Virus Res.* **43**, 275-302.
- Burnette, W. N. (1981). 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**, 195-203.

- Collett, M.S., Larson, R., Gold, C., Strick, D., Anderson, D.K., and Purchio, A.F. (1988). Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhea virus. *Virology* **165**, 191-199.
- Corapi, W.V., Donis, R.O., and Dubovi, E.J. (1988). Monoclonal antibody analyses of cytopathic and noncytopathic viruses from fatal bovine viral diarrhea virus infections. *J. Virol.* **62**, 2823-2827.
- Deng, R., and Brock, K.V. (1992). Molecular cloning and nucleotide sequence of a pestivirus genome, noncytopathogenic bovine viral diarrhea virus strain SD-1. *Virology* **191**, 867-879.
- Deng, R. and Brock., K.V. (1993). 5' and 3' untranslated regions of pestivirus genome: primary and secondary structure analyses. *Nucleic Acids Res.* **21**, 1949-1957.
- Desport, M., Collins, M. E., and Brownlie, J. (1998). Genome instability in BVDV: An examination of the sequence and structural influences on RNA recombination. *Virology* **246**, 352-361.
- Devereux, J., Haeverli, P., and Smithies, O., (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Red.* **12**, 387-395.
- Donis, R.O., Corapi, W., and Dubovi, E.J. (1988). Neutralizing monoclonal antibodies to bovine viral diarrhea virus bind to the 56k to 58k glycoprotein. *J. Gen. Virol.* **69**, 77-86.
- Dugaiczyk, A., Boyer, H. W., and Goodman, H. M. (1975). Ligation of EcoRI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. *Journal of Molecular Biology* **96**, 171-184.
- Egger, D., Wölk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H.E., Moradpour, D., and Bienz, K. (2002). Expression of Hepatitis C Virus Proteins Induces Distinct Membrane Alterations Including a Candidate Viral Replication Complex. *J. Virol.* **76**, 5974-5984.
- Elbers, K., Tautz, N., Becher, P., Stoll, D., Rümnapf, T., and Thiel, H.-J. (1996). Processing in the pestivirus E2-NS2 region: identification of proteins p7 and E2p7. *J. Virol.* **70**, 4131-4135.
- Fricke, J., Gunn, M., and Meyers, G. (2001). A family of closely related bovine viral diarrhea virus recombinants identified in an animal suffering from mucosal disease: new insights into the development of a lethal disease in cattle. *Virology* **291**, 77-90.
- Furuta, S., Miura, K., Copeland, T., Shang, W.H., Oshima, A., and Kamata, T. (2002). Light Chain 3 associates with a Sos 1 guanine nucleotide exchange factor: its significance in the Sos1-mediated Rac1 signaling leading to membrane ruffling. *Oncogene* **21**, 7060-7066.
- Gale, M.Jr., Korth, M.J., Tang, N.M., Tan, S.L., Jopkins, D.A., Dever, T.E., Polyak, S.J., Gretch, D.R., and Katze, M.G. (1997). Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology* **230**, 217-227.

- Gillespie, J.H., Coggins, L., Thompson, J., and Baker, J.A. (1961). Comparison by neutralization tests of strains of virus isolated from virus diarrhea and mucosal disease. *Cornell Vet.* **51**, 155-159.
- Grassmann, C.W., Isken, O., and Behrens, S.-E. (1999). Assignment of the multifunctional NS3 protein of bovine viral diarrhea virus during RNA replication: an in vivo and in vitro study. *J. Virol* **73**, 9196-9205.
- Grassmann, C.W., Isken, O., Tautz, N., and Behrens, S.-E. (2001). Genetic analysis of the pestivirus nonstructural coding region: defects in the NS5A unit can be complemented in trans. *J. Virol.* **75**, 7791-7802.
- Griffin, S.D.C., Beales, L.P., Clarke, D.S., Worsfold, O., Evans, S.D., Jaeger, J., Harris, M.P.G., and Rowlands, J. (2003). The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS L.* **535**, 34-38.
- Gunn, M., and Weavers, E. (1992). Mucosal disease in cattle housed in isolation. *Vet. Rec.* **131**, 376.
- Harada, T., Tautz, N., and Thiel, H.-J. (2000). E2-p7 region of the bovine viral diarrhea virus polyprotein: processing and functional studies. *J. Virol.* **74**, 9498-9506.
- Harding, T.M., Hefner-Gravnik, A., Thumm, M., and Klionsky, S.J. (1996). Genetic and phenotypic overlap between autophagy and the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway. *J. Biol. Chem.* **271**, 17621-17624.
- Hulst, M.M., Himes, G., Newbiggin, E., and Moormann, R.J.M. (1994). Glycoprotein E2 of classical swine fever virus: expression in insect cells and identification as a ribonuclease. *Virology* **200**, 558-565.
- Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., Noda, T., and Ohsumi, Y. (2000). An ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* **408**, 488-492.
- Jordan, R., Wang, L., Graczyk, T.M., Block, T.M., and Romano, P.R. (2002). Replication of a cytopathic strain of bovine viral diarrhea virus activates PERK and induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of MDBK cells. *J. Virol.* **76**, 9588-9599.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* **19**, 5720-5728.
- Kessler, S. W. (1981). Use of protein A-bearing staphylococci for the immunoprecipitation and isolation of antigens from cells. *Methods Enzymol.* **73**, 442-459.
- Kim, J., Scott, S.V., Oda, M., and Klionsky, D.J. (1997). Transport of a large oligomeric protein by the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway. *J. Cell Biol.* **137**, 609-618.
- Kirisako, T., Baba, M., Ishihara, N., Miyazawa, K., Ohsumi, M., Yoshimori, T., Noda, T., and Ohsumi, Y. (1999). Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *J. Cell Biol.* **147**, 435-446.

- Kirisako, T., Ichimura, Y., Okada, H., Kabeya, Y., Mizushima, N., Yoshimori, T., Ohsumi, M., Takao, T., Noda, T., and Ohsumi, Y. (2000). The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J. Cell. Biol.* **151**, 263-275.
- Kirkegard, K., and Baltimore, D. (1986). The mechanism of RNA recombination in poliovirus. *Cell* **47**, 433-443.
- Klionsky, D.J. (1998). Nonclassical protein sorting to the yeast vacuole. *J. Biol. Chem.* **273**, 10807-10810.
- Klionsky, D.J., Cueva, R., and Yaver, D.S. (1992). Aminopeptidase I of *Saccharomyces cerevisiae* is localized to the vacuole independent of the secretory pathway. *J. Cell Biol.* **119**, 287-299.
- Klionsky, D.J., and Ohsumi, Y. (1999). Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**, 1-32.
- Kümmer, B.M., Tautz, N., Becher, P., Thiel, J.-J., and Meyers, G. (2000). The genetic basis for cytopathogenicity of pestiviruses. *Vet. Microbiol.* **77**, 117-128.
- Kümmerer, B., and Meyers, G. (2000). 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**, 390-400.
- Kupfermann, H., Thiel, H.-J., Dubovi, E.J., and Meyers, G. (1996). Bovine viral diarrhea virus: characterization of a cytopathogenic defective interfering particle with two internal deletions. *J. Virol.* **70**, 8175-8181.
- Lang, T., Schaeffeler, E., Bernreuther, D., Bredschneider, M., Wolf, D.H., and Thumm, M. (1998). Aut2p and Aut7p, two novel microtubule-associated proteins are essential for delivery of autophagic vesicles to the vacuole. *EMBO J.* **17**, 3597-3607.
- Legesse-Miller, A., Sagiv, Y., Porat, A., and Elazar, Z. (1998). Isolation and characterization of a novel low molecular weight protein involved in intra-Golgi traffic. *J. Biol. Chem.* **273**, 3105-3109.
- Legesse-Miller, A., Sagiv, Y., Glozman, R., and Elazar, Z., (2000). Aut7p, a soluble autophagic factor, participates in multiple membrane trafficking processes. *J. Biol Chem.* **275**, 32966-32973.
- Liess, B., Orban, S., Frey, H.-R., Trautwein, G., Wiefel, W., and Blindow, H. (1984). Studies on transplacental transmissibility of bovine virus diarrhea (BVD) vaccine virus in cattle. *Zentralbl. Veterinärmed. B.* **31**, 669-681.
- Lindenbach, B.D. and Rice, C.M. (2001). Flaviviridae: the viruses and their replication. In: *Virology*, 4th ed., edited by B.N. Fields. Lippincott-Raven, Philadelphia, New York, pp. 991-1042.
- Mann, S.S., and Hammarback, J.A. (1994). Molecular characterization of light chain 3. A microtubule binding subunit of MAP1A and MAP1B. *J. Biol. Chem.* **269**, 11492-11497.

- Marino, G., Uria, J.A., Puente, X.S., Quesada, V., Bordallo, J., and Lopez-Otin, C. (2002). Human autophagins, a family of cysteine proteinases potentially implicated in cell degradation by autophagy. *J. Biol. Chem.* **278**, 3671-3678.
- McKercher, D.G., Saito, J.K., Grenshaw, G.L. and Bushnell, R.B. (1968). Complications in cattle following vaccination with a combined bovine viral diarrhea - infectious bovine rhinotracheitis vaccine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **152**, 1621-1624.
- Meyer, C., von Freyburg, M., Elbers, K., and Meyers, G. (2002). Recovery of virulent and RNase-negative attenuated type 2 bovine viral diarrhea viruses from infectious cDNA clones. *J. Virol.* **76**, 8494-8503.
- Meyers, G., Rügenapf, T., and Thiel, H.-J. (1989). Ubiquitin in a togavirus. *Nature* **341**, 491.
- Meyers, G., Tautz, N., Dubov, E.J., and Thiel, H.-J. (1991). Viral cytopathogenicity correlated with integration of ubiquitin-coding sequences. *Virology* **180**, 602-616.
- Meyers, G., Tautz, N., Stark, R., Brownlie, J., Dubovi, E.J., Collett, M.S., and Thiel, H.-J. (1992). Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic pestiviruses. *Virology* **191**, 368-386.
- Meyers, G., Stoll, D., and Gunn, M. (1998). Insertion of a sequence encoding light chain 3 of microtubule-associated proteins 1A and 1B in a pestivirus genome: Connection with virus cytopathogenicity and induction of a tethal disease in cattle. *J. Virol.* **72**, 4139-4148.
- Meyers, G., Saalmüller, A., and Buttner, M., (1999). Mutations abrogating the RNase activity in glycoprotein E(rns) of the pestivirus classical swine fever virus lead to virus attenuation. *J. Virol.* **73**, 10224-10235.
- Meyers, G., and Thiel, H.-J. (1996). Molecular characterization of pestiviruses. *Adv. Virus Res.* **47**, 53-118.
- Miller, R.H., and Purcell, R.H. (1990). Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestivirus and flavivirus as well as members of two plant virus supergroups. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2057-2061.
- Moormann, R.J.M., Warmerdam, P.A.M. van de Meer, B., Schaaper, W.M.M., Wensvoort, G., and Hulst, M.M. (1990). Molecular cloning and nucleotide sequence of hog cholera virus strain Brescia and mapping of the genomic region encoding envelope protein E1. *Virology* **177**, 184-198.
- Nagy, P.D., and Simon, A.E. (1997). New insights into the mechanism of RNA recombination. *Virology* **235**, 1-9.
- Noda, T., Suzuki, K., and Ohsumi, Y. (2002). Yeast autophagosomes: de novo formation of a membrane structure. *Trends Cell Biol.* **12**, 231-235.
- Olafsen, P., MacCallum, A.D., and Fox, F.H. (1946). An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet.* **36**, 205-213.

- Pocock, D.H., Howard, C.J., Clarke, M.C., and Brownlie, J. (1987). Variation in the intracellular polypeptide profiles from different isolates of bovine virus diarrhoea virus. *Arch. Virol.* **94**, 43-53.
- Poole, T.L., Wang, C., Popp, R.A., Potgieter, L.N.D., Siddiqui, A., and Collett, M.S. (1995). Pestivirus translation initiation occurs by internal ribosome entry. *Virology* **206**, 750-754.
- Qi, F., Ridpath, J.F., and Berry, E.S. (1998). Insertion of a bovine SMT3B gene in NS4B and duplication of NS3 in a bovine viral diarrhoea virus genome correlate with the cytopathogenicity of the virus. *Virus Res.* **57**, 1-9.
- Ramsey, F.K., and Chivers, W.H. (1953). Mucosal disease of cattle. *North Amer. Vet.* **34**, 629-633.
- Reed, K.E., Gorgalenya, A.E., and Rice, C.M. (1998). The NS5A/NS5 proteins of viruses from three genera of the family flaviviridae are phosphorylated by associated serine/threonine kinases. *J. Virol.* **72**, 6199-6206.
- Rice, C.M. (1996). Alphavirus-based expression systems. *Adv. Exp. Med. Biol.* **297**, 31-40.
- Rijnbrand, R., van der Straaten, T., van Rijn, P.A., Spaan, W.J., and Bredenbeek, P.J. (1997). Internal entry of ribosomes is directed by the 5' noncoding region of classical swine fever virus and is dependent on the presence of an RNA pseudoknot upstream of the initiation codon. *J. Virol.* **71**, 451-457.
- Rümenapf, T., Unger, G., Strauss, J.H., and Thiel, H.-J. (1993). Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. *J. Virol.* **67**, 3288-3294.
- Rümenapf, T., Stark, R., Heimann, M., and Thiel, H.-J. (1998). N-terminal protease of pestiviruses: identification of putative catalytic residues by site-directed mutagenesis. *J. Virol.* **72**, 2544-2547.
- Sagiv, Y., Legesse-Miller, A., Porat, A., and Elazar, Z. (2000). GATE-16, a membrane transport modulator, interacts with NSF and the Golgi v-SNARE GOS-28. *EMBO J.* **19**, 1494-1504.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, J., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Schägger, H., and von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range of 1-100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379.
- Scherz-Shouval, R., Sagiv, Y., Shorer, H., and Elazar, Z. (2003). The COOH terminus of GATE-16, an intra-Golgi transport modulator, is cleaved by the human cysteine protease HsApg4A. *J. Biol. Chem.* **278**, 14053-8.

- Schlesinger, S. (2001). Alphavirus vectors: development and potential therapeutic applications. *Expert. Opin. Biol. Ther.* **1**, 177-191.
- Schneider, R., Unger, G., Stark, R., Schneider-Scherzer, E., and Thiel, H.-J. (1993). Identification of a structural glycoprotein of an RNA virus as a ribonuclease. *Science* **261**, 1169-1171.
- Scott, S.V., Hefner-Gravink, A., Morano, K.A., Noda, T., Ohsumi, Y. and Klionsky, D.J. (1996). Cytoplasm to vacuole targeting and autophagy employ the same machinery to deliver proteins to the yeast vacuole. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 12304-12308.
- Scott, S.V., Baba, M., Ohsumi, Y., and Klionsky, D.J. (1997). Aminopeptidase I is targeted to the vacuole by a nonclassical vesicular mechanism. *J. Cell Biol.* **138**, 37-44.
- Stark, R., Meyers, G., Rumenapf, T., and Thiel, H.-J. (1993). Processing of pestivirus polyprotein: cleavage site between autoprotease and nucleocapsid protein of classical swine fever virus. *J. Virol.* **67**, 7088-7095.
- Steffens, S., Thiel, H.-J., and Behrens, S.-E. (1999). The RNA-dependent RNA polymerases of different members of the family *Flaviviridae* exhibit similar properties under *in vitro* conditions. *J. Gen. Virol.* **80**, 2583-2590.
- Suzuki, K., Kirisako, T., Kamada, Y., Mizushima, N., Noda, T., and Ohsumi, Y. (2001). The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J.* **20**, 5971-5981.
- Tamura, J.K., Warrender, P. and Collett, M.S. (1993). RNA-stimulated NTPase activity associated with the p80 protein of the pestivirus bovine viral diarrhea virus. *Virology* **193**, 1-10.
- Tanida, I., Komatsu, M., Ueno, T., and Kominami, E. (2003). GATE-16 and GABARAP are authentic modifiers mediated by Apg7 and Apg3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **300**, 637-644.
- Tautz, N., Meyers, G., and Thiel, H.-J. (1993). Processing of poly-ubiquitin in the polyprotein of an RNA virus. *Virology* **197**, 74-85.
- Tautz, N., Thiel, H.-J., Dubovi, E.J., and Meyers, G. (1994). Pathogenesis of mucosal disease: A cytopathogenic pestivirus generated by an internal deletion. *J. Virol.* **68**, 3289-3297.
- Tautz, N., Meyers, G., Stark, R., Dubovi, E.J., and Thiel, H.-J. (1996). Cytopathogenicity of a pestivirus correlates with a 27-nucleotide insertion. *J. Virol.* **70**, 7851-7858.
- Tautz, N., Elbers, K., Stoll, D., Meyers, G., and Thiel, H.-J. (1997). Serine protease of pestiviruses: determination of cleavage sites. *J. Virol.* **71**, 5415-5422.
- Tautz, N., Harada, T., Kaiser, A., Rinck, G., Behrens, S.-E., and Thiel, H.-J. (1999). Establishment and characterization of cytopathogenic and noncytopathogenic pestivirus replicons. *J. Virol.* **73**, 9422-9432.

- Thiel, H.-J., Stark, R., Weiland, E., Rümenapf, T., and Meyers, G. (1991). Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. *J. Virol.* **65**, 4705-4712.
- Thiel, H.-J., Plagemann, P.G.W., Moenning, V. (1996). Pestiviruses. In: Fields, B.N. (Ed.), *Virology*, 3rd Edition. Raven, Philadelphia, PA, pp. 1059-1074.
- Thumm, M., and Kadowaki, T. (2001). The loss of *Drosophila* APG4/AUT2 function modifies the phenotypes of cut and Notch signaling pathway mutants. *Mol. Genet. Genomics.* **266**, 657-663.
- Towbin, H., Staehlelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
- Wang, H., and Olsen, R.W. (2000). Binding of the GABA(A) receptor-associated protein (GABARAP) to microtubules and microfilaments suggests involvement of the cytoskeleton in GABARAPGABA(A) receptor interaction. *J. Neurochem.* **75**, 644-655.
- Warrener, P., and Collett, M.S. (1995). Pestivirus NS3 (p80) protein possesses RNA helicase activity. *J. Virol.* **69**, 1720-1726.
- Weiland, E., Stark, R., Haas, B., Rümenapf, T., Meyers, G., and Thiel, H.-J. (1990). Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide linked heterodimer. *J. Virol.* **64**, 3563-3569.
- Weiland, E., Ahl, R., Stark, R., Weiland, F., and Thiel, H.-J. (1992). A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a pestivirus, hog cholera virus. *J. Virology* **66**, 3677-3682.
- White, K.A., and Morris, T.J. (1994). Nonhomologous RNA recombination in tombusvirus: Generation and evolution of defective interfering RNAs by stepwise deletions. *J. Virol.* **68**, 14-24.
- White, K. A., and Morris, T.J. (1995). RNA determinants of junction site selection in RNA virus recombinants and defective interfering RNAs. *RNA* **1**, 1029-1040.
- Windisch, J.M., Schneider, R., Stark, R., Weiland, E., Meyers, G., and Thiel, H.-J. (1996). RNase of classical swine fever virus: biochemical characterization and inhibition by virus-neutralizing monoclonal antibodies. *J. Virol.* **70**, 352-358.
- Wiskerchen, M., Belzer, S.K., and Collett, M.S. (1991). Pestivirus gene expression: the first protein product of the bovine viral diarrhea virus large open reading frame, p20, possesses proteolytic activity. *J. Virol.* **65**, 4508-4514.
- Wiskerchen, M., and Collett, M.S. (1991). Pestivirus gene expression: protein p80 of bovine viral diarrhea virus is a proteinase involved in polyprotein processing. *Virology* **184**, 341-350.
- Xu, J., Mendez, E., Caron, P.R., Lin, C., Murcko, M.A., Collett, M.S., and Rice, C.M. (1997). Bovine viral diarrhea virus NS3 serine proteinase: polyprotein cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of an enzyme essential for pestivirus replication. *J. Virol.* **71**, 5312-5322.

Yu, H., Grassmann, C.W., and Behrens, S.-E. (1999). Sequence and structural elements at the 3' terminus of bovine viral diarrhea virus genomic RNA: functional role during RNA replication. *J. Virol.* **73**, 3638-3648.

Yu, H., Isken, O., Grassmann, C.W., and Behrens, S.-E. (2000). A stem-loop motif formed by the immediate 5'-terminus of the bovine viral diarrhea virus genome modulates translation as well as replication of the viral RNA. *J. Virol.* **74**, 5825-5835.

Zhong, W., Gutshall, L.L., and Del Vecchio, A.M. (1998). Identification and characterization of an RNA dependent RNA polymerase activity the non-structural protein 5B region of bovine viral diarrhea virus. *J. Virol.* **72**, 9365-9369.

Zhou, B., and Rabinovitch, M. (1998). Microtubule involvement in translational regulation of fibronectin expression by light chain 3 of microtubule-associated protein 1 in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* **83**, 481-489.

7 Veröffentlichungen

Publikationen:

Fricke, J., Gunn, M., and Meyers, G. (2001). A Family of closely related Bovine Viral Diarrhea Virus recombinants identified in an animal suffering from Mucosal Disease: New insights into the development of a lethal disease in cattle. *Virology* **291**, 77-90.

Schlender, J., Walliser, G., Fricke, J., and Conzelmann, K.-K. (2002). Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein Mediates Inhibition of Mitogen-Induced T-Cell Proliferation by Contact. *J. Virol.* **76**, 1163-70.

Fricke, J., Voss, C., Thumm, M., and Meyers, G. (2003). Analysis of proteases specific for light chain 3 (LC3) of microtubule-associated proteins reveal striking functional conservation of the processing system. (submitted)

Kongresse:

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Bremen, März 1999. Poster: Fricke, J., Walliser, G., Conzelmann, K.-K. *Das RSV Fusionsprotein F vermittelt die Infektion von Zellen mit Tollwut (RSV F) Pseudotyp Viren in Abwesenheit von RSV G und SH.*

Sixth International Symposium on Positive Strand RNA Viruses, Paris (Frankreich), Mai / Juni 2001. Poster: Fricke, J., and Meyers, G. *BVDV Isolate JaCP: evidence for cleavage of one site in the polyprotein by a novel cellular protease.*

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Erlangen, April 2002. Poster: Fricke, J., Gunn, M., and Meyers, G. *BVDV Isolate JaCP: New Insights into the Development of Lethal Mucosal Disease in Cattle.*

8 Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich an dieser Stelle

- bei meinem Doktorvater PD Dr. Gregor Meyers, der mir ein interessantes Thema bereitstellte, mir mit manchem hilfreichen Tipp zur Seite stand, mich stets frei und selbständig arbeiten ließ, mir für Diskussionen zur Verfügung stand und das Erstgutachten anfertigte
- bei Prof. Dr. H. Probst für die Anfertigung des Zweitgutachtens
- bei Dr. Walter Fuchs, der mir an der Ostsee die Arbeit mit Hefe nähergebracht hat
- bei Dr. Hubert Kalbacher für die Bereitstellung von Protease-Antisera und Stocherkahn
- bei Prof. Dr. Michael Thumm und Dr. Christiane Voss für die Durchführung der Komplementationsversuche in Hefe
- bei Dr. Daniela Vollmer und Dr. Gerold Schwarz, die immer schon als Kommilitonen ein offenes Ohr für mich hatten
- bei Dipl.-Biochem. Thomas Kast und Dr. Waldemar Vollmer, die mir immer fleißig Publikationen zukommen ließen
- bei den Mitarbeitern der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere in Tübingen
- beim Ochsens Jasper († 1989)

Ein ganz herzliches Dankeschön geht ausserdem an meine Eltern, die mir das Studium ermöglicht und mich all die langen Jahre finanziell, moralisch und tatkräftig unterstützt haben, wann immer ich sie gebraucht habe.

Für die geduldige Unterstützung in guten und in schlechten Zeiten bedanke ich mich ebenfalls herzlich bei meiner Freundin stud. phil. Katharina Brielmaier.

Meine akademischen Lehrer:

Bisswanger, Bock, Bohley, Breyer-Pfaff, Buchholz, Büsen, Choudhary, Conzelmann,
Duszenko, Eisele, Fröhlich, Gauglitz, Gebhardt, Gerisch, Götz, Günzl, Hagenmaier,
Hamprecht, Hanack, Hofschneider, Hollack, Jürgens, Jung, Kalbacher, Kostka, Mayer,
Mebatsion, Mecke, Metzner, Meyers, Nakel, Pfeiffer, Pommer, Probst, Rammensee, Reutter,
Staudt, Stegmann, Voelter, Wegmann, Werringloer, Weser, Wiesinger, Zillig