

**Studien zur Genomorganisation
und Polyproteinprozessierung bei Caliciviren
von Kaninchen und Katzen**

Dissertation

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

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2001

vorgelegt von

Jörg Oliver Thumfart

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Oktober 2001

Dekan: Prof. Dr. H. Probst

1. Berichterstatter: PD Dr. G. Meyers

2. Berichterstatter: Prof. Dr. P. Bohley

Meiner Mutter

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Gregor Meyers am Institut für Immunologie der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere in Tübingen angefertigt.

Mein herzlicher Dank gilt

PD Dr. Gregor Meyers für die Überlassung des interessanten Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und aller anderen notwendigen Voraussetzungen sowie seine kompetente Betreuung mit Vermittlung vieler für mich neuer Methoden und seine immer unaufgeregte Diskussionsbereitschaft,

Prof. Dr. Peter Bohley für seine Bereitschaft, diese Arbeit gegenüber der Fakultät zu vertreten und das Zweitgutachten dieser Arbeit zu übernehmen und die kritische Durchsicht dieser Arbeit mit vielen Korrekturvorschlägen,

Silke Eßlinger und Petra Wulle für die Vermittlung mancher Methode und ihre hervorragende technische Unterstützung,

Maren Ziegler für ihre hervorragende technische Unterstützung,

Dr. Martina von Freyburg, Dr. Erdmute Diehl, Dr. Ilse Reimann und Dr. Horst Schirrmeier für die Immunisierung und Blutung von Kaninchen bzw. die Gewinnung von Antiseren für FCV,

Wilfried Kramer, der mir sehr half, alles richtig ins Bild zu setzen,

den übrigen Mitarbeitern der BFAV Tübingen, ohne die das wissenschaftliche Arbeiten überhaupt nicht möglich gewesen wäre,

meiner Mutter für ihre grenzenlose Geduld und bedingungslose Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	
Inhalt	I
Abkürzungen	V
Impressum	VIII
1 Einführung	1
1.1 Caliciviren	1
1.2 Ziel der Arbeit	9
2 Material und Methoden	11
2.1 Material	11
2.1.1 Geräte	11
2.1.2 Verbrauchsmaterial	13
2.1.3 Reagenzien	13
2.1.4 Radiochemikalien	16
2.1.5 Oligonukleotide	16
2.1.6 Enzyme	16
2.1.7 Kits	17
2.1.8. Antiseren und monoklonale Antikörper	18
2.1.8.1 Antiseren	18
2.1.8.2 Monoklonale Antikörper	18
2.1.9 Bakterienstämme und Bakteriophagen	18
2.1.10 Plasmide	18
2.1.11 Zellen und Virusstämme	19
2.1.11.1 Zellen	19
2.1.11.2 Virusstämme	19
2.1.12 Zellkulturmedien	19
2.1.13 Stammlösungen und Medien	20
2.2 Methoden	22
2.2.1 Gewebekultur	22
2.2.1.1 Infektion von CRFK-Zellen	22
2.2.1.2 Bestimmung der Zahl lebender Zellen	22
2.2.1.3 Titration von Felinen Caliciviren und Titerberechnung	22

2.2.1.4	Indirekte Immunfluoreszenz	23
2.2.1.5	Peroxidase-Färbung	23
2.2.1.6	Metabolische Markierung von FCV-Proteinen in CRFK-Zellen	24
2.2.1.7	Transfektion von CRFK-Zellen mit RNA	24
2.2.1.8	Kristallviolett-färbung	25
2.2.2	Transiente Expression viraler Proteine im T7-Vacciniavirus-System	25
2.2.2.1	Radioaktive <i>in vivo</i> Markierung transient transfizierter Zellen	25
2.2.3	Mikrobiologische Methoden	26
2.2.3.1	Anzucht von Bakterien	26
2.2.3.2	Dauerkulturen	26
2.2.3.3	Herstellung transformationskompetenter Bakterien	26
2.2.3.4	Hitzeschock-Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien	27
2.2.3.5	Plasmidpräparation für Test-/Kontrollzwecke	27
2.2.3.6	Plasmidpräparation zur Gewinnung großer DNA-Mengen	28
2.2.4	Spektrophotometrische Analyse von Nukleinsäuren	29
2.2.5	Methoden zur Isolierung und Analyse von RNA	29
2.2.5.1	Diethylpyrocarbonat-Behandlung von Lösungen	29
2.2.5.2	RNA-Isolierung aus Zellen	29
2.2.5.3	RNA-Agarosegelelektrophorese	30
2.2.5.4	Northern Blot	30
2.2.5.4.1	Transfer von RNA auf Filter	30
2.2.5.4.2	RNA / DNA-Hybridisierung	31
2.2.5.5	cDNA-Bibliothek	32
2.2.6	Standard DNA-Techniken	33
2.2.6.1	Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren	33
2.2.6.2	Ethanol-fällung von DNA	33
2.2.6.3	Isopropanol-fällung von DNA	33
2.2.6.4	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	33
2.2.6.5	Herstellung glatter Enden an DNA-Molekülen	34
2.2.6.6	Dephosphorylierung von DNA	34
2.2.6.7	Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase	34
2.2.6.8	DNA-Agarosegelelektrophorese	35
2.2.6.9	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	35
2.2.6.10	Radioaktive Markierung von DNA durch „Nick“-Translation	35

2.2.6.11	Gelfiltration von Nukleinsäuren	36
2.2.7	Polymerasekettenreaktion (PCR)	36
2.2.7.1	Reverse Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	36
2.2.7.2	Polymerasekettenreaktion (PCR)	37
2.2.8	Sequenzierung von DNA	37
2.2.8.1	Sequenzierung von Plasmid-DNA	37
2.2.8.2	Elektrophorese von Sequenzreaktionen im Harnstoff-Acrylamid-Gel	38
2.2.9	Gerichtete Mutagenese	38
2.2.9.1	Phosphorylierung und Hybridisierung von Mutagenese-Oligonukleotiden	39
2.2.10	<i>In vitro</i> Transkription	39
2.2.11	<i>In vitro</i> Translation	40
2.2.12	Proteinanalytische Methoden	41
2.2.12.1	Radioimmunpräzipitation	41
2.2.12.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	42
2.2.12.3	Gelbehandlung und Fluorografie	42
2.2.13	RNA-Quantifizierung mittels Phospho-Imager Analyse	43
2.2.14	Expression und Analyse rekombinanter Proteine in Bakterien	44
2.2.15	Protein-Elektroelution mittels Biotrap	45
2.2.16	Western Blot	45
2.2.17	Immunisierung von Kaninchen und Präparation der Antiseren	46
2.2.18	Software	46
3	Ergebnisse	47
3.1	Ergebnisse mit Rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV)	47
3.1.1	RHDV-Expressionsklon pR1 228	47
3.1.2	Detektion der RHDV-Proteine nach transienter Expression	48
3.1.3	Einführung und Analyse von Spaltstellen-Mutanten	53
3.1.4	Kinetik der Polyproteinprozessierung	60
3.1.5	Polyklonales Serum gegen das postulierte „p5“	62
3.1.6	Die Spaltstelle am N-Terminus von p5 / p18	64
3.2	Arbeiten zu Felines Calicivirus (FCV)	70
3.2.1	FCV-2024 Sequenz	70
3.2.1.1	cDNA-Bibliothek	70
3.2.1.2	RT-PCR	71
		III

3.2.1.3	Sequenzierung	71
3.2.1.4	FCV-2024 Sequenz	72
3.2.2	Infektiöser cDNA-Klon	72
3.2.2.1	Etablierung eines geeigneten Plasmid-Vektors	72
3.2.2.2	Aufbau des Gesamtklons	73
3.2.2.3	Unterscheidung wt-FCV2024 und infektiöser Klon	75
3.2.2.4	Nachweis der Infektiosität von RNA, die von pIK12 abgeleitet wurde	75
3.2.3	Charakterisierung des infektiösen FCV-Klons	77
3.2.4	Transfektionseffizienz von RNA	78
3.2.5	Produktion infektiöser Partikel	79
3.2.6	Etablierung eines FCV-Replikons	83
3.3	Polyklonale anti-FCV-Seren	87
3.3.1	PCR-Produkte und Expressionsklonierung	87
3.3.2	Proteinreinigungen	89
3.3.3	Nachweis einzelner FCV-Polyproteinprozessierungsprodukte	90
4	Diskussion	97
4.1	Rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV)	97
4.2	Felines Calicivirus (FCV)	106
5	Zusammenfassung	117
6	Literatur	121
7	Anhang	131
7.1	Oligonukleotide für Arbeiten mit FCV	131
7.2	Oligonukleotide für Arbeiten mit RHDV	134
7.3	Oligonukleotide für Arbeiten in anderen Systemen	135
7.4	Proteine zur Gewinnung von FCV-Antiseren	136
7.5	Veröffentlichte, vollständige FCV-Nukleotidsequenzen	136
7.6	Veröffentlichung	136

Abkürzungen

A	Adenin	CSFV	„classical swine fever virus“
Abb.	Abbildung		(Virus der klassischen
Ac	Acetat		Schweinepest)
Amp	Ampicillin	CTP	Cytidintriphosphat
APS	Amoniumperoxodisulfat	dATP	Desoxyadenosintriphosphat
AS	Aminosäure	dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ATP	Adenosintriphosphat	DEAE	Diethylaminoethyl
BFAV	Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere	DEPC	Diethylpyrocarbonat
BHK-21	„baby hamster kidney“-Zellen	dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
bp	Basenpaar	DMSO	Dimethylsulfoxid
BSA	Rinderserumalbumin („bovine serum albumin“)	DNA	Desoxyribonukleinsäure
C	Cytosin	dNTP	Desoxyribonukleosidtri- phosphat
°C	Grad Celsius	ds	Doppelstrang
Cam	Chloramphenicol	DTT	1,4-Dithiothreitol
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-1- propan-sulfonsäure	dTTP	Desoxythymidintriphosphat
cDNA	komplementäre DNA	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Ci	Curie	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
CIP	„calf intestinal phosphatase“	EGTA	1,2-Bis-(2-Aminoethoxy- ethan)-Tetraessigsäure
cm	Zentimeter	EMCV	Encephalomyocarditis Virus
cp	cytopathogen	EtBr	Ethidiumbromid
cpe	cytopathogener Effekt	EtOH	Ethanol
cpm	„counts per minute“ (Zählrate per Minute)	FCS	fötales Kälberserum („fetal calf serum“)
CRFK	„Crandell Reese feline kidney“ (stabile Katzen- Nierenzellen-Zelllinie)	FCV	Felines Calicivirus
C-terminal	carboxyterminal	FITC	Fluoresceinisothiocyanat
C-Terminus	Carboxyterminus	G	Guanin
CIP	„calf intestine phosphatase“	g	Gramm
			Erdbeschleunigung
		GTP	Guanosintriphosphat
		h	Stunde

ABKÜRZUNGEN

Hel	Helikase	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure	PBS	„phosphate buffered saline“
IgG	Immunglobulin G	PCR	Polymerasekettenreaktion
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid	PEG	Polyethylenglykol
IRES	„internal ribosome entry site“ (cap-unabhängige Ribosmen-Bindungsstelle einer mRNA)	pfu	„plaque forming unit“ infektiöse Einheiten
Kan	Kanamycin	p. i.	post infectionem
kb	Kilobasen	PIPES	Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfonsäure)
kDa	Kilodalton	PO	Peroxidase
l	Liter	Pol	Polymerase (meint in dieser Arbeit immer die RdRp)
LB	Luria-Bertrani	Pro	Protease
M	Molar	PV	Poliovirus
mAK	monoklonale(r) Antikörper	PVDF	Polyvinylidendifluorid
MG	Molekulargewicht	RdRp	RNA-abhängige RNA-Polymerase
min	Minute	rGTP	GTP mit unverändertem Zucker, im Gegensatz zu dGTP
m.o.i.	„multiplicity of infection“	RHDV	„rabbit hemorrhagic disease virus“
MOPS	3-(N-Morpholino)propan-sulfonsäure	RIP	Radioimmunpräzipitation
MVA	modifiziertes Vaccinia-Virus, Stamm Ankara	RNA	Ribonukleinsäure
ncp	nicht cytopathogen	RNase	Ribonuklease
NSP	Nichtstruktur-Protein	RT	Raumtemperatur
nt	Nukleotid	RT-PCR	Reverse PCR
NTA	„Nitrilotriaceticacid“	SAP	„shrimps alkaline phosphatase“
N-terminal	aminoterminal	SDS	Natriumdodecylsulfat
N-Terminus	Aminoterminus	sec	Sekunde
NV	Norwalk Virus	SSC	„sodium chloride/sodium citrate (buffer)“
OD	Optische Dichte		Kochsalz-Citrat-Puffer
ORF	offener Leserahmen /-Raster („open reading frame“)		
PAA	Polyacrylamid		

ABKÜRZUNGEN

SV	Southampton Virus	U	„units“ (Enzymeinheiten)
T	Thymin	UpM	Umdrehungen pro Minute
Tab.	Tabelle	UTP	Uridintriphosphat
TAE	Tris Acetat EDTA-Puffer	UV	Ultraviolett
TBE	Tris Borat EDTA-Puffer	VP	Virusprotein
TCP	Trypsin-ähnliche Cystein- Protease	VPg	„virus protein, genome lin- ked“ Protein einiger +-Strang- RNA-Viren, das die cap- Struktur ersetzt
TEMED	N, N, N', N'-Trismethyl- ethylendiamin		
Tet	Tetracyclin	v/v	Volumenprozent
Tricin	N-Tris(hydroxymethyl)- methylglycin	w/v wt	Gewichtsprozent Wildtyp
Tris	Tris(hydroxymethyl)- aminoethan		
TS	Transkriptionspuffer		

Aminosäuren (Ein-Buchstaben-Code):

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

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

Impressum

Autor: Jörg Oliver Thumfart
Gottlieb-Olpp-Str. 25
72076 Tübingen

Verlag: Erschienen im Selbstverlag 2001

ISBN 3-00-008782-6

1. Einführung

1.1 Caliciviren

Die Familie Caliciviridae umfasst eine Reihe von Krankheitserregern bei Menschen und Tieren, die bisher wenig charakterisiert worden sind. Die Eingruppierung von Viren in die Familie Caliciviridae erfolgte aufgrund charakteristischer morphologischer und molekularbiologischer Eigenschaften (Green et al., 2000). Es gibt Hinweise, dass neben den bekannten Pathogenen weitere Caliciviren vorkommen, die nicht direkt mit einem Krankheitsgeschehen in Zusammenhang gebracht werden können (Capucci et al., 1996). Die Tatsache, dass nach einem Wirtswechsel eines Calicivirus von einer marinen Spezies auf das Schwein eine hochgefährliche Krankheit zu beobachten war (Smith et al., 1998), und die Erkenntnis, dass der Erreger der tödlichen hämorrhagischen Kaninchenseuche („rabbit hemorrhagic disease virus“ RHDV) vermutlich auf ungeklärte Weise aus einem harmlosen Darmparasiten entstanden ist (Capucci et al., 1996), machen diese wenig untersuchte Virusfamilie unter medizinischen Aspekten interessant.

Die Familie Caliciviridae gliedert sich zur Zeit in die 4 Genera „Norwalk-like“ Virus, „Sapporo-like“ Virus, Vesivirus und Lagovirus. Dabei beinhalten die Genera Norwalk-like Virus und Sapporo-like Virus die humanpathogenen Vertreter. Ihre Bezeichnung erfolgte jeweils nach dem Ort des ersten charakterisierten Krankheitsausbruchs eines entsprechenden Vertreters. Diese Viren sind in der Regel Erreger von Gastroenteritiden, die im jeweils betroffenen Personenkreis zu Durchfall und Erbrechen führen. Auch Kopf- und Gliederschmerzen sowie Fieber sind häufige, aber wenig charakteristische Symptome dieser kaum untersuchten Krankheiten. Nach 2 bis 5 Tagen mit klinischer Symptomatik ist die Infektion ohne bleibende Schäden überwunden. Ein Krankenhausaufenthalt ist in der Regel nicht notwendig (Kapikian et al., 1996; Kaplan et al., 1982; Lew et al., 1994).

Das Feline Calicivirus (FCV) ist der bekannteste Vertreter des Genus Vesivirus und wurde 1968 zum ersten Mal beschrieben (Povey und Hale, 1974). Es ist einer der beiden Hauptverursacher des „infektiösen Katzenschnupfens“, einer weltweit verbreiteten Infektion, die die häufigste Viruserkrankung von Katzen darstellt. Die betroffenen Tiere leiden unter einer z. T. eitrigen Infektion der oberen und unteren Atemwege mit Nasenausfluss und Bildung von Geschwüren auf der Zunge. Auch Niesen und Bindehautentzündungen gehören zu den typischen Symptomen, die alleine oder in Kombination vorhanden sein können. Erwachsene Katzen

erholen sich in der Regel nach einigen Tagen, wenn keine zusätzlichen Infektionen hinzukommen. Wirklich gefährlich ist diese Infektion nur für junge Tiere. Insgesamt kann die Sterblichkeit bis zu 30 % betragen (Lindner, 2000).

Das 4. Genus trägt den Namen Lagovirus. Dabei weist der Genusname darauf hin, dass die bisher bekannten Viren dieser Gruppe bisher nur „Lagomorphe“, also „Hasenartige“, infizieren. Den Prototyp dieses Genus stellt das RHDV dar, ein relativ neues Virus, das erstmals bei einem Seuchenausbruch 1984 in China in Erscheinung trat (Liu et al., 1984). Mittlerweile ist diese Kaninchenkrankheit fast weltweit verbreitet und zeigt den dramatischsten Verlauf unter allen Erkrankungen, die durch Caliciviren ausgelöst werden. Ihre klinischen Kennzeichen sind hohe Mortalität und Morbidität für erwachsene Kaninchen (älter als ca. 2-3 Monate). Nach einer kurzen Inkubationszeit bricht die Krankheit „schlagartig“ aus und etwa 90 % der infizierten Tiere sterben. Als pathologisch-anatomische Veränderungen sind am auffälligsten die gestörte Blutgerinnung, die sich in Blutungen in allen Geweben und Organen des Bauch- und Brustraumes äußert, und eine meist ausgeprägte Nekrose der Leber. Bei einer experimentellen Infektion vergehen vom Zeitpunkt der Infektion bis zum Tod z. T. nur 30 Stunden. Junge Kaninchen (jünger als 2-3 Monate) erkranken nicht, entwickeln aber hohe Antikörper-Titer (Ohlinger et al., 1989; Xu und Chen; 1989; Fuchs und Weissenböck, 1992; Jung et al., 2000).

Die Caliciviren bilden 30 bis 40 nm große, unbehüllte Nukleokapside mit ikosaedrischer Symmetrie. Die charakteristischen kelchförmigen Vertiefungen im Kapsid der Virionen waren dabei namensgebend für die Virusfamilie (calix, lat. Kelch). Gebildet wird das Kapsid aus einem Hauptkapsidprotein von ca. 60 kDa (VP60 beim RHDV). 180 Monomere des Hauptkapsidproteins (Schaffer et al., 1980) dimerisieren wahrscheinlich in einem ersten Schritt zu 90 Kapsomeren, die sich dann zum Kapsid zusammenfügen (Prasad et al., 1999). Eine interessante Beobachtung ist, dass das VP60 spontan zu virus-ähnlichen Partikeln („virus like particles“, VLP) assembliert. (Prasad et al., 1994, 1999; Laurent et al., 1994; Sibia et al., 1995; Jiang et al., 1992; Geissler et al., 1999). Bei RHDV wurde als erstem Calicivirus die Existenz eines zweiten Strukturproteins (VP10) im Kapsid nachgewiesen (Wirblich et al., 1996), das aber in substöchiometrischem Verhältnis zu VP60 vorliegt und für die Bildung von VLPs nicht notwendig ist (Wirblich et al., 1996, Meyers unveröffentlicht). Analysen von virus-ähnlichen Partikeln und Virionen des Norwalk-Virus (NV) zeigten ebenfalls die Präsenz eines zweiten, kleineren Proteins im Kapsid. Die vorhandenen positiven Nettoladungen und das Vorkommen im Kapsid der Caliciviren haben zu der Vermutung geführt, dass diesem Protein eine Funktion bei der Verpackung der viralen RNA in das Kapsid zukommt (Neill et

al., 1991). Für das FCV wurde berichtet, dass vermutlich nur 1 bis 2 Kopien des nach Gelanalysen nur etwa 8,5 kDa großen Proteins im Viruskapsid enthalten sein sollen (Sosnovtsev und Green 2000).

Caliciviren wurden ursprünglich zu den Picornaviren gezählt. Grund hierfür waren vornehmlich morphologische Ähnlichkeiten und das etwa 7,5 kb große einzelsträngige RNA-Genom positiver Polarität, das am 5´ Ende ein als VPg („virus proteine, genome linked“) bezeichnetes virales Protein trägt (Schaffer et al., 1980) und am 3´ Ende polyadenyliert ist (Ehresmann und Schaffer 1977). Die weitere, insbesondere molekularbiologische Untersuchung dieser Viren hat aber gravierende Unterschiede aufgedeckt und zur Gründung der Familie Caliciviridae geführt.

Die zentralen Unterschiede zwischen Picorna- und Caliciviren betreffen die Strategie der Gen-expression und die generelle Organisation des Genoms. Im Gegensatz zu Picornaviren, bei denen die genomische RNA die Translation sämtlicher viraler Proteine steuert, transkribieren Caliciviren eine subgenomische mRNA, die der Expression der Strukturproteine dient. Diese etwa 2,4 kb große RNA ist 3´ coterminale zum viralen Genom und erstreckt sich über die Region des Genoms, die für das Hauptkapsidprotein VP60 und minore Kapsidprotein VP10 kodiert (Meyers et al., 1991b).

Bisher ist nicht bekannt, nach welchem Mechanismus diese subgenomische RNA exprimiert wird. Für das RHDV wurde das 5´ Ende der RNA analysiert (Meyers et al., 1991b). Demnach startet die mRNA mit einer Sequenz, die hohe Homologie zum 5´ Ende des Genoms zeigt. Auch bei anderen Caliciviren findet sich in der fraglichen Region eine Sequenz mit Ähnlichkeit zum Anfang des Genoms, wobei die Übereinstimmungen z. B. bei FCV geringer ausgeprägt sind (Carter et al., 1992a). Es ist zu vermuten, dass die Sequenzen am 5´ Ende des Genoms oder der subgenomischen mRNA bzw. die dazu komplementären Sequenzen des Minus-Stranges als Signal für die Transkriptionsinitiation dienen.

Die subgenomische mRNA von Caliciviren besitzt einige ungewöhnliche Eigenschaften. So ist sie wie das Genom mit einem VPg versehen, das in Analogie zu anderen Viren kovalent an das 5´ Ende der jeweiligen RNA gebunden ist (Meyers et al., 1991b, Herbert et al., 1997; Machin et al., 2001). Im Gegensatz zu den Picornaviren, bei denen das VPg nur aus relativ wenigen Aminosäuren besteht, findet sich bei den Caliciviren ein Protein von ca. 12 bis 14 kDa (Dunham et al., 1998; Meyers et al., 1991b; Herbert et al., 1997; Schaffer et al., 1980; Wirblich et al., 1996). Dieser Größenunterschied sollte auch funktionell bedeutsam sein und tatsächlich zeichnet sich ab, dass das Calicivirus-VPg eine Rolle bei der Translationsinitiation

besitzt (Herbert et al., 1997, Wirblich 1995). Neben dieser Funktion könnte die Bindung des VPg an die mRNA auch darauf hindeuten, dass, wie bei den Picornaviren beschrieben (Paul et al., 1998), das VPg eine Funktion bei der Transkription erfüllt, so dass virale RNA prinzipiell nur mit VPg gebildet werden kann.

Eine weitere Auffälligkeit der subgenomischen mRNA ist, dass sie offensichtlich in Viruspartikel verpackt wird (Meyers et al., 1991b). Zudem gibt es Hinweise, dass die mRNA in der infizierten Zelle separat repliziert wird, denn es findet sich minussträngige mRNA (Carter et al., 1990). Damit verhält sich die subgenomische RNA in mehreren Beziehungen eher wie ein Genomsegment und nicht wie eine normale mRNA. Bisher ist allerdings völlig unklar, ob diese Besonderheiten funktionell bedeutsam sind.

Ausgehend von der subgenomischen RNA wird bei Vertretern der Genera Lagovirus, Norwalk-like Virus und Sapporo-like Virus das Hauptkapsidprotein translatiert. Beim Genus Vesivirus (FCV) dagegen stellt das primäre Translationsprodukt einen Vorläufer dar, aus dem durch Prozessierung durch die virale Protease das Hauptkapsidprotein und ein kleines Spaltstück (124 AS, ~15 kDa) unbekannter Funktion entsteht (Carter et al., 1992a, b; Matsuura et al., 2000).

Der Mechanismus, der zur Expression des minoren Kapsidproteins (VP10) führt, ist bislang noch weitestgehend ungeklärt. Dieses Protein wird von einem separaten Leseraster („open reading frame“ ORF) kodiert, das bei allen Caliciviren am 3' Ende des Genoms zu finden ist. Die naheliegende Hypothese, dass die Expression über eine weitere subgenomische mRNA erfolgen könnte, wurde durch entsprechende Daten aus FCV-infizierten Zellkulturen gestützt (Carter et al., 1990), doch haben sich diese Ergebnisse später als artifiziell herausgestellt. Nach *in vitro* Translation und nach transienter Expression konnte für RHDV, FCV und NV gezeigt werden, dass das VP10 sowohl ausgehend von der genomischen als auch der subgenomischen RNA entstehen kann (Wirblich et al., 1996; Glass et al., 2000; Meyers et al., 2000; Sosnovtsev und Green 2000). Damit ist die Bildung dieses Proteins eine intrinsische Eigenschaft der viralen RNA. Vermutlich wird durch einen besonderen Mechanismus zur Translationsinitiation ein definiertes Mengenverhältnis zwischen VP10 und VP60 eingestellt. Die Größe des Proteins variiert in der Virusfamilie erheblich: Sie reicht von 106 Kodons bei FCV bis 212 Kodons bei NV und auch das apparente Molekulargewicht dieses basischen Proteins schwankt überraschend von etwa 8,5 kDa (FCV) bis 23-35 kDa (NV) (Clarke und Lambden 1997; Green et al., 2000; Glass et al., 2000).

Neben dem 3' terminalen ORF finden sich im Genom von Caliciviren - je nach Genus - noch ein oder zwei weitere funktionelle ORFs. Beim RHDV deckt ein als ORF1 bezeichnetes lan-

ges Leseraster etwa 95 % des gesamten Genoms ab und kodiert für die Nicht-Struktur-Proteine (NSP) und das Hauptkapsidprotein. Dagegen ist bei den Vesiviren (FCV) der ORF1 nur für die Expression der NSP zuständig, während das Hauptkapsidprotein als Vorläufer (p75) in einem eigenen Leserahmen (ORF2) kodiert wird.

Bei allen Caliciviren wird das Leseraster #1 (ORF1) - wie das einzige, lange Leseraster im Genom von Picornaviren - in ein Polyprotein translatiert, das anschließend in die einzelnen Virusproteine prozessiert wird (Clarke und Lambden 1997; Green et al., 2000). Dabei ist die Abfolge der Polypeptide mit bekannten oder angenommenen Funktionen vergleichbar (s. Abb. 1). Genauer untersucht wurde der Prozess der Polyproteinprozessierung bisher vor allem für das RHDV, das SV (Southampton Virus) und z. T. das FCV (Wirblich et al., 1996; König et al., 1998; Sosnovtseva et al., 1999; Clarke et al., 2000). Die bisher publizierten Daten sprechen dafür, dass bei Caliciviren alle erforderlichen Spaltungen von der bekannten, intrinsischen viralen Protease vorgenommen werden. Dabei handelt es sich um eine Cystein-Protease, deren räumliche Struktur aber eindeutige Ähnlichkeiten zu der klassischen Serin-Proteasen aufweist (Bazan und Flatterick 1988; Wirblich et al., 1995). Entsprechend sind diese Enzyme auch eingeordnet (Barrett und Rawlings 2001). In der Literatur findet sich sogar der aus biochemischer Sicht unglückliche Begriff „TCP“ für „trypsin-like cysteine protease“ (Gorbalenya et al., 1989; Neill 1990; Woessner et al., 1998). Auffällig ist dabei auch die Veränderung der Spalteigenschaften: Trypsin spaltet nach basischen Aminosäuren und die caliciviralen Proteasen meist nach sauren Aminosäuren. Arbeiten zur viralen Protease, die N-terminale Sequenzierung von Spaltprodukten und Mutagenese-Studien an prognostizierten Spaltsequenzen erlaubten es, einen Teil der Spaltstellen im viralen Polyprotein zu lokalisieren (s. Abb. 1). Beim RHDV konnten fast alle Positionen ermittelt werden, während für das FCV zur Zeit lediglich zwei Spaltstellen im ORF1 bekannt sind (Boniotti et al., 1994; Wirblich et al., 1995, 1996; Alonso et al., 1996; Sosnovtseva et al., 1999; Clarke et al., 2000; Joupert et al., 2000; Meyers et al., 2000).

Auch in Bezug auf die Genomorganisation gibt es einen fundamentalen Unterschied zwischen Picorna- und Caliciviren. Während bei Picornaviren die 4 Kapsidproteine (VP1-4), die das Kapsid in stöchiometrisch gleichen Zahlenverhältnissen bilden, vom 5'-terminalen Bereich der viralen RNA kodiert werden (Rueckert 1996), sind bei Caliciviren die entsprechenden Gene für 2 Kapsidproteine am 3' Ende des Genoms zu finden (Green et al., 2000, Clarke und Lambden 1997).

Neben diesem auffälligen Unterschied weisen die Vertreter der beiden Virusfamilien aber auch überraschende Übereinstimmungen in der Genomorganisation auf, die sich vor allem in der Anordnung und (prognostizierten) Funktion der Nichtstrukturproteine zeigen. So findet sich bei beiden Virusfamilien am 3' Ende des fraglichen Genombereichs ein geschlossener Block, der für das VPg (Picornavirus-Nomenklatur: 3B), die Protease (Pro, 3C) und die RNA-abhängige RNA-Polymerase (Pol, 3D), das Hauptenzym der viralen RNA-Replikation, kodiert. Die Identität dieser Proteine und ihre enzymatische Funktion wurde bei den Caliciviren in den letzten Jahren insbesondere für das RHDV gezeigt (Wirblich et al., 1996; König et al., 1998; Meyers et al., 2000; Boniotti et al., 1994; Marin et al., 2000; Vasquez et al., 2000). Weitere Untersuchungen betreffen das Feline Calicivirus (FCV) und andere Vesiviren (Dunham et al., 1998; Herbert et al., 1997; Schaffer et al., 1980; Sosnovtseva et al., 1999; Wei et al., 2001) sowie die humanen Caliciviren (Clarke et al., 2000, Pfister und Wimmer 2001), während für andere Caliciviren im Wesentlichen Daten aus Sequenzvergleichen vorliegen. In demjenigen Bereich, der diesem zentralen Block vorgelagert ist, findet sich bei den Vertretern beider Familien ein Protein, das dNTPase und (vermutlich) Helikaseaktivität besitzt; enzymatische Analysen wurden jedoch bei den Caliciviren lediglich für das RHDV-Protein und ein Translationsprodukt des Norwalk Virus durchgeführt (Marin et al., 2000; Pfister und Wimmer 2001). Das RHDV ist auch bisher der einzige Vertreter der Familie, für den eine weitestgehend vollständige Genomkarte vorliegt (Wirblich et al., 1996; König et al., 1998; Meyers et al., 2000). Darüber hinaus liegen detailliertere Vorstellungen zur Genomorganisation auch für das humane Southhampton Virus (SV) vor (Clarke et al., 2000).

Zusammenfassend kann man festhalten, dass für das RHDV zur Genomorganisation und Polyproteinprozessierung für alle Caliciviren bislang die meisten Daten veröffentlicht wurden und am ehesten ein geschlossenes Bild entstanden ist. Danach werden durch vier Spaltungen zunächst 5 Produkte generiert. Auf das N-terminale p16 mit ungeklärter Funktion folgt ein posttranslational z. T. wohl modifiziertes Protein mit 60-65 kDa. Daran schließt sich das p41 an, dem der gemeinsame „Vorläufer“ für Protease und Polymerase (p72) folgt. Das Hauptkapsidprotein VP60 bildet den Abschluss des ORF1. Formal betrachtet können in einer weiteren „Spaltungsrunde“ p60/65, p41 und p72 nochmals in kleinere Spaltstücke prozessiert werden (Wirblich 1995, et al., 1996). Für alle Spaltungen gilt, dass noch keine Informationen über Hierarchien und zeitlichen Verlauf vorliegen. Begriffe wie Vorläufer bzw. primäre/sekundäre Prozessierungsprodukte sollen lediglich klarmachen, dass die nachgewiesenen Proteine unterschiedlicher Größe auf derselben genetischen Grundlage basieren. Dabei wird p60/65 in p23/p26 und das p37 gespalten und das p72 in die Polymerase (p58) und die virale

Protease (p15). Unklarheiten zur Prozessierung bestehen noch in Bezug auf die mittlere Region des ORF1-Translationsproduktes, aus der das p41 hervorgeht. Die Prozessierung von p41 in das VPg (p13/p14) und ein p29 ist dabei gesichert. Offensichtlich ist auch, dass das p29 weiter gespalten wird, wobei ein weiteres ca. 23 kDa Protein (p23/2) als Prozessierungsprodukt erhalten wird. Allerdings blieb unklar, ob das p23/2 das amino- oder carboxyterminale Stück darstellt. Das noch fehlende Prozessierungsprodukt von ca. 5 kDa wurde bisher nicht nachgewiesen (König et al., 1998). Auch wurden bisher noch nicht alle Protease-Schnittstellen identifiziert. Das vorhandene Wissen faßt die folgende Abbildung 1 zusammen:

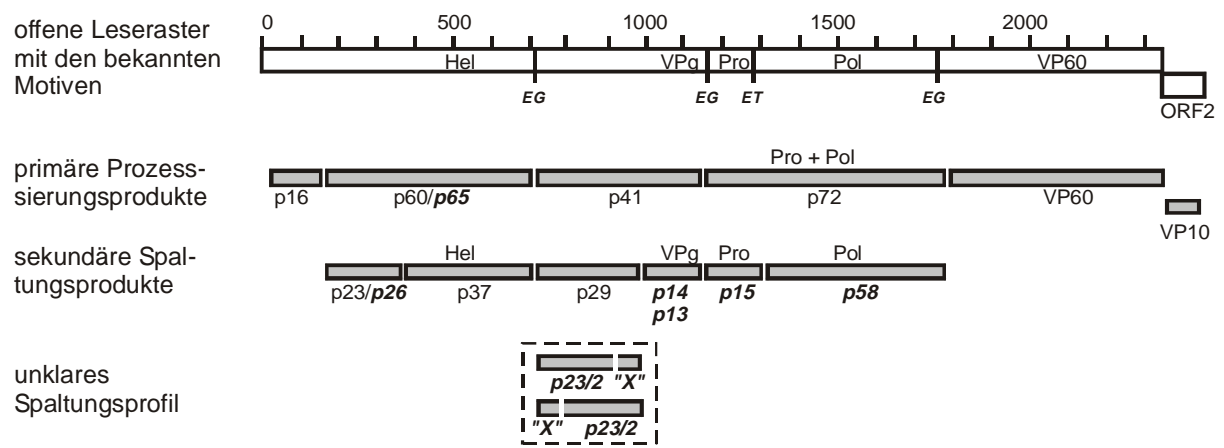


Abb. 1: Genomorganisation und Polyproteinprozessierung bei RHDV.

P1/P1'-Aminosäuren bekannter Spaltstellen im ORF1-Polyprotein sind im 1-Buchstaben-Kode angegeben. Proteine mit nachgewiesener Funktion (Hel: Helikase; Pro: Protease; Pol: Polymerase) sind bezeichnet.

Bei einer formalen Gegenüberstellung der Genomorganisation des RHDV und der des Poliovirus (PV) als Beispiel für ein Picornavirus (Abb. 2) zeigen sich über die oben genannten Entsprechungen hinaus weitere Ähnlichkeiten, die die Zahl und ungefähre Größe der einzelnen Proteine sowie die Verteilung von hydrophoben bzw. hydrophilen Bereichen innerhalb der verschiedenen Polypeptide betreffen.

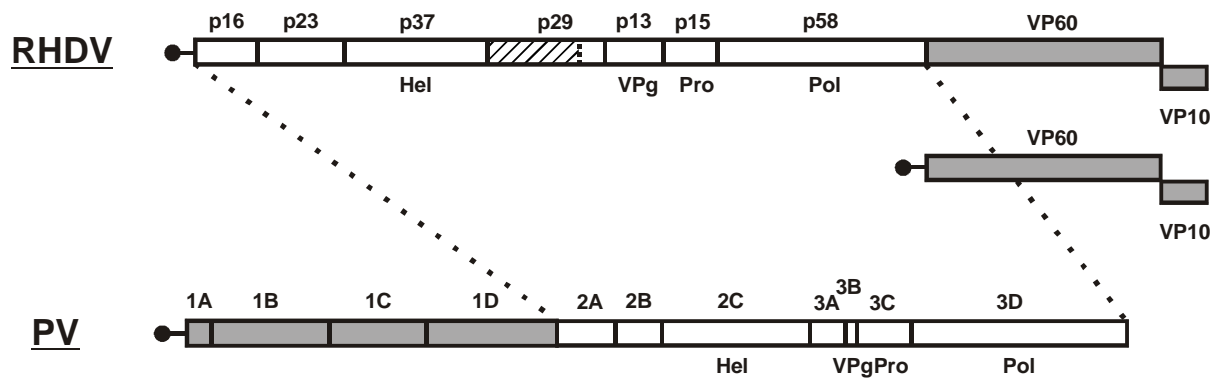


Abb.2: Genomorganisation von RHDV und PV im Vergleich

Die Balken repräsentieren die Leseraster. Weiß: Nichtstrukturproteine; grau: Strukturproteine. Schraffiert bei RHDV ist das mögliche zusätzliche Protein der Caliciviren. N-terminal ist das VPg dargestellt, die 5'- und 3'-Nicht-translatierenden Regionen sind nicht dargestellt.

Auffällig ist aber der Unterschied im Bereich des p41 (vgl. Abb. 1). Hier ist zwar bei RHDV die Prozessierung noch nicht abschließend geklärt, aber es deutet alles auf einen gravierenden Unterschied zu den Picornaviren hin: Caliciviren kodieren in diesem Bereich wohl für ein zusätzliches Protein (Teil des p29).

Auch für die vorliegende Arbeit war wichtig, dass sich viele Caliciviren nicht in einfachen Gewebe- oder Zellkultursystemen vermehren lassen. Dies gilt für RHDV und die anderen Vertreter des Genus Lagovirus und für die humanen Caliciviren. Erstaunlich ist dabei, dass trotz intensiver Studien noch nicht einmal die Zellen, in denen sich das RHDV im Wirt vermehrt, eindeutig identifiziert worden sind (Kimura et al., 2001). Für das RHDV wurde aufgrund von Untersuchungen mit infizierten Kaninchen aber ein prägnanter Lebertropismus beschrieben (Ohlinger et al., 1990). Basierend auf dieser Erkenntnis konnte ein System etabliert werden, das über Infektionsversuche mit primären Kaninchen-Hepatocyten wichtige Daten zur Genomorganisation des RHDV erbrachte und die Gültigkeit der mit transienten Expressionssystemen ermittelten Daten bestätigte (König et al., 1998). Allerdings ist dieses System aus diversen praktischen Gründen nicht für Routineuntersuchungen geeignet, so dass man für weitergehende Studien an RHDV auf transiente Expressionssysteme angewiesen bleibt.

Im Gegensatz zu den oben genannten Caliciviren gibt es hervorragende Gewebekultursysteme für alle Vertreter des Genus Vesivirus, zu dem auch das FCV gehört. Damit sind Vesiviren zur Zeit am besten für Studien zur Replikation, deren Regulation und zur Funktion von RNA-Strukturen bzw. viralen Proteinen geeignet. Es ist daher nicht überraschend, dass es für das FCV als dem am besten untersuchten Vertreter dieses Genus gelungen ist, einen infektiösen

cDNA Klon zu etablieren, von dem ausgehend nach *in vitro* Transkription und Transfektion von RNA infektiöses Virus erhalten werden konnte (Sosnovtsev und Green 1995). Leider stand dieser Klon – trotz der Zusage der Urheber und entgegen der wissenschaftlichen Gepflogenheiten – für die vorliegende Arbeit nicht zur Verfügung.

1.2 Zielsetzung

Ziel der nachfolgend beschriebenen Arbeit war es, das Wissen über die Genomorganisation des RHDV zu vervollständigen und die molekularbiologischen und proteinchemischen Grundlagen für vergleichende Studien beim FCV zu etablieren. Darüber hinaus sollte für weitergehende Analysen zur Funktion viraler Proteine und RNA-Strukturen ein infektiöser Klon für das FCV etabliert werden.

Hinter diesem Projekt steht als Fernziel, aus den Daten zu zwei Caliciviren verschiedener Genera prinzipielle Erkenntnisse über die Molekularbiologie der Vertreter dieser Virusfamilie zu gewinnen und diese Daten mit den erheblich besser untersuchten Picornaviren in Beziehung zu setzen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

ABI-PRISM 377 DNA Sequencer und Zubehör	Applied Biosystems, Weiterstadt
Begasungsbrutschrank 3166	Forma Sci., Marietta, Ohio, USA
Biotrap BT 1000	Schleicher & Schuell, Dassel
Branson Ultraschallgerät Sonifier B-30, B-15	Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Brutschränke mit CO ₂ -Begasung: B 50 61 EK/CO ₂	Heraeus, Osterode
Colora UF 75 450 S (-70°C)	Colora, Mühlheim
Diavert-Invertmikroskop	Leitz, Wetzlar
Eismaschine AF 10	Scotsman
Filmkassetten	Agfa, Köln
Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axioskop	Zeiss, Oberkochen
Gefriertrocknungsanlage ALPHA I/6	Martin Christ, Osterode
Gelelektrophoresekammern, horizontal	BRL, BFAV-Eigenbau
Gelelektrophoresekammern, vertikal	Hoefler, BFAV-Eigenbau
Geltrockner SE 1150	Hoefler, San Francisco, CA, USA
Gene Amp PCR-System 9600	Perkin Elmer, Überlingen
Glasgeräte	Schott, Mainz
Herolab E.A.S.Y. Geldokumentationssystem	Herolab, Wiesloch
Hybridisierungsschrank HY 400	Bachhofer, Reutlingen
Inkubationsschüttler G-25	New Brunswick, Edison, NJ, USA
Kühlschrank Liebherr KT1920	Liebherr, Ochsenhausen
Kühlwasserbad	Haake, Karlsruhe
Laminar-flow-Reinraumarbeitsplatz, LFR 80 VU	Prettl, Pfullingen
Liquid Scintillation Analyser, Trio Carb 2100 TR	Packard, Groningen, Niederlande
LKB 2219 MultiTempII Thermostatic Circulator	LKB, München
LKB 2301 Macrodrive 1 Power Supply	LKB, München
Magnetrührer, beheizbar: IKAMAG RCT	IKA Labortechnik, Staufen i. Br.
Mettler J-Serie Waagen	Mettler-Toledo, Gießen
Microcomputer Electrophoresis Power Supply 250 / 1000	Renner, Dannstadt

Mikroprozessor-pH-Meter 743, Knick	Bachhofer, Reutlingen
Mikrowellengerät HMG 760/62.B	Bosch, Gerlingen
Phosphoimager Fujifilm BAS 1500	Fujifilm, Düsseldorf
Photoapparatur MP4 Hand Kamera	Polaroid, Cambridge, MA, USA
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
	Gilson, Villiers-le Bel, Frankreich
Radioaktivitätsmeßgerät Mini Assay Typ 6-20	Mini Instruments (Bebig, Berlin)
Red Rotor Model PR70	Hofer, San Francisco, CA, USA
Röntgenfilmentwicklungsmaschine QX 130	Konica, Hohenbrunn
Sartorius Analytic A 200 S (Feinwaage)	Sartorius, Göttingen
Semi-Phor TE70 (Semi-dry transfer unit)	Hofer, San Francisco, CA, USA
Speed Vac Concentrator (Savant)	Bachhofer, Reutlingen
Spektrophotometer DU-64	Beckman, München
Sterilbank Lamin Air HLP 2472 GS / HB 2472	Heraeus, Osterode
Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Tiefkühlschrank Liebherr (-20°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Transilluminator (254 nm)	Bachhofer, Reutlingen
Transilluminator (302 nm)	R. Vetter, Ammerbuch
Trio-Thermoblock (für PCR)	Biometra, Göttingen
Ultraspec 3000 (UV/VIS-Spektrophotometer)	Amersham-Pharmacia, Freiburg
UV-Leuchte	Bachhofer, Reutlingen
UV Stratalinker 1800	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Vakuumtrockenofen	Heraeus, Osterode
Vortex Vibrofix VF1 (IKA)	Bachhofer, Reutlingen
Wasserbad Julabo U3/ F20/ SW20C	Bachhofer, Reutlingen
Zentrifugen:	
Kühltischzentrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge J2-21	Beckman, München
Laborzentrifuge: Minifuge GL, Varifuge RF	Heraeus, Osterode
Tischultrazentrifuge TL-100	Beckman, München
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifugen: TGA 65, Centrikon T-2070	Kontron Instruments, München

Rotoren:

JA10, JA17, JS13.1,

SW41Ti, TLA 45

TST 54

Beckman, München

Beckman, München

Kontron Instruments, München

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Bio-Trap Membranen BT1/ BT2

Einmalspritzen

Filterpapier 3MM

Gewebekultur-Kunststoff-Einmalartikel

Glasfaserfilter GF/C

Kanülen, Plastikspritzen

(Halb-)Mikroreaktionsgefäße

Nitrozellulose BA 83 (Ref.-# 401396, 0,2 µm)

Nylonmembranen (Duralon)

Nukleinsäure Transfer Membran Hybond N⁺

Pipettenspitzen

Polaroid-Filme Typ 665, 667

Röntgenfilme. BioMax MR

Zentrifugenröhrchen, Polyallomer-Röhrchen

Schleicher & Schuell, Dassel

Braun, Melsungen

Whatman, Maidstone, GB

Greiner, Frickenhausen

Whatman, Maidstone, GB

Terumo, Leuven, Belgien

Eppendorf, Hamburg

Schleicher & Schuell, Dassel

Stratagene, La Jolla, CA, USA

Amersham, Braunschweig

Greiner, Frickenhausen

Polaroid, Cambridge, MA, USA

Kodak, Rochester, NY, USA

Beckman, München

2.1.3 Reagenzien

0.24-9.5 Kb RNA Ladder

1 Kb Plus DNA Ladder

Acridinorange (research grade)

Acrylamid-Stammlösungen

Agarose für die Gelelektrophorese

Aminoethylcarbazol (AEC)

Ammoniumsulfat

Ampicillin (Amp)

Ammoniumperoxodisulfat APS

Bacto-Agar

GibcoBRL, Eggenstein

GibcoBRL, Eggenstein

Serva, Heidelberg

AppliChem, Darmstadt

GibcoBRL, Eggenstein

Fluka, Taufkirchen

Merck, Darmstadt

Serva, Heidelberg

Serva, Heidelberg

Difco Lab., Detroit, MI, USA

Bacto-Hefeextrakt	Difco Lab., Detroit, MI, USA
Bacto-Trypton	Difco Lab., Detroit, MI, USA
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, München
BlueDextran/ EDTA	Perkin Elmer, Überlingen
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA (Rinderserumalbumin; Fraktion V)	Sigma, Deisenhofen
Cäsiumchlorid	Gibco BRL, Eggenstein
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brillant Blue G250	Serva, Heidelberg
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma, Deisenhofen
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)	Amersham-Pharmacia, Freiburg
DMF (N, N-Dimethylformamid)	Fluka, Taufkirchen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
DTT (Dithiothreitol)	Boehringer Mannheim
EDTA, Ethylendiaminetetraacetat-dinatriumsalz	Serva, Heidelberg
EGTA, 1,2-Bis-(2-Aminoethoxyethan)-Tetraessigsäure	Sigma, Deisenhofen
En ³ hance	Du Pont, Bad Homburg
Erythrosin B	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure (HAc)	Hoechst, Dortmund
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid (EtBr)	Merck, Darmstadt
FCS (fötale Kälberserum)	PAA, Seromed
Formalin	Merck, Darmstadt
Formamid	GibcoBRL, Eggenstein
Freundsches Adjuvans, inkomplett	Sigma, Deisenhofen
Glycerin (87 %)	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glyoxal (40%)	Fluka, Taufkirchen
Guanidiniumisothiocyanat	GibcoBRL, Eggenstein
Harnstoff	Merck, Darmstadt
HEPES	Fluka, Taufkirchen
IPTG (Isopropylthiogalaktosid)	Roth, Karlsruhe

Kaliumacetat (KAc)	Riedel de Haen, Taufkirchen
Kanamycin (Kan)	Sigma, Deisenhofen
Lauryl-Sarcosinat (N-Lauryl-Sarcosin)	Sigma, Deisenhofen
LipofectAMINE Reagent	GibcoBRL, Eggenstein
Lipofectin Reagent	GibcoBRL, Eggenstein
Lithiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
MPL+TDM+CWS Adjuvant System	Sigma, Deisenhofen
Natriumacetat-Trihydrat (NaAc)	Roth, Karlsruhe
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdesoxycholat (95 %) (DOC)	Sigma, Deisenhofen
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Ni^{2+} -NTA-Agarose	Qiagen, Hilden
Nonidet P40	Boehringer Mannheim
Nukleosidtriphosphate (NTPs)	PeqLab, Erlangen
Orange G	Fluka, Taufkirchen
PAGE-Plus 40% Concentrate	AMRESCO, Solon, Ohio, USA
Pefablock SC (AEBSF)	Boehringer Mannheim
Penicillin G	Grünenthal, Stolberg
Phenol für DNA-Extraktion, Tris-gesättigt	AppliChem, Darmstadt
Phenol für RNA-Extraktion, H_2O -gesättigt	AppliChem, Darmstadt
Phenolrot	Merck, Darmstadt
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Roth, Karlsruhe
Proteingrößenstandard, gefärbt, für PAGE	NEB, Frankfurt/M.
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Merck, Darmstadt
Sephadex G-50 und G-15 Säulenmaterial	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Streptomycin	Hefa Pharma, Werne
Sucrose (Saccharose)	Serva, Heidelberg
SuperFect Transfection Reagent	Qiagen, Hilden

TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylendiamin)	Serva, Heidelberg
Tricin (N-[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-glycin)	ICN, Eschwege
Tris (Trishydroxymethylaminomethan)	GibcoBRL, Eggenstein
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Trizol Reagenz	GibcoBRL, Eggenstein
tRNA (aus Hefe)	Boehringer Mannheim
Tween-20	Sigma, Deisenhofen
Ultima Gold, Szintillationsflüssigkeit	Packard., Groningen, Niederlande
Xylencyanol FF	Fluka, Taufkirchen

2.1.4 Radiochemikalien

α [³² P] dCTP (3000 Ci/mmol, 1000 mCi/ml)	ICN, Eschwege
[³⁵ S] Trans-Label (1175 Ci/mmol, 10,5 mCi/ml)	ICN, Eschwege
L-[³⁵ S]-Cystein (1075 Ci/mmol, 10 mCi/ml)	ICN, Eschwege
L-[³⁵ S]-Methionin (1175 Ci/mmol, 10 mCi/ml)	ICN, Eschwege
[¹⁴ C]- Protein-Molekulargewichtsstandard	Amersham-Buchler, Braunschweig

2.1.5 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide für PCR und Sequenzierung wurden von Gibco BRL bezogen. Alle Oligonukleotide wurden vom Hersteller frei von Schutzgruppen, entsalzt und lyophilisiert geliefert. Zu den Sequenzen und Zuordnungen zu den jeweiligen Genomen/Plasmiden vergleiche im Anhang.

2.1.6 Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIP, SAP)	Boehringer-Mannheim
DNA Polymerase I, Klenow-Fragment	NEB, Frankfurt/M.
DNase I	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Lysozym (chicken egg white, cryst. res. grade)	Serva, Heidelberg
Pfu DNA Polymerase	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Proteinase K	Boehringer Mannheim
Restriktionsendonukleasen	NEB, Boehringer, AGS
	BRL, Pharmacia, MBI Fermentas

RNase A	Amersham-Pharmacia, Freiburg
RNasin (recombinant ribonuclease Inhibitor)	Promega, Madison, WI, USA
SuperScript II (RNase H ⁻ Reverse Transcriptase)	Gibco BRL, Eggenstein
Taq-DNA-Polymerase	Appligene, Heidelberg
T4-DNA-Ligase	NEB, Frankfurt/M.
T4-DNA-Polymerase	NEB, Frankfurt/M.
T4-Polynukleotidkinase	NEB, Frankfurt/M.
T7-RNA-Polymerase	NEB, Amersham-Pharmacia

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

2.1.7 Kits

ABI TM PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt
cDNA-Synthese Kit	Amersham-Pharmacia, Freiburg
ECL (Western blot Detektion)	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Jet Star Plasmid Purification System	Genomed, Bad Oeynhausen
Lambda ZAP II / EcoRI cloning Kit, predigested	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Nick Translation Kit	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Nucleobond AX Plasmid purification protocoll	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin Extract	Macherey-Nagel, Düren
Nucleotrap Kit	Macherey-Nagel, Düren
QIAEX DNA Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce, Rockford, IL, USA
TNT T7 Coupled Reticulocyte Lysate System	Promega, Madison, WI, USA

2.1.8 Antiseren und monoklonale Antikörper

2.1.8.1 Antiseren

Polyklonales anti-FCV-Serum

Prof. M. Büttner, BFAV

Die in dieser Arbeit verwendeten Antiseren gegen RHDV-Proteine wurden von C. Wirblich hergestellt und bereits in die Literatur eingeführt (Wirblich et al., 1995, 1996; König et al., 1998). Eine Ausnahme bildet das Serum gegen p5, dessen Herstellung in dieser Arbeit beschrieben wird.

Im Verlauf dieser Arbeit wurden polyklonale Seren gegen mehrere FCV-Polypeptide erzeugt (Kaninchen-Immunsierung: Dr. Schirrmeier, BFAV Insel Riems). Vergleiche dazu die Tabelle im Anhang.

2.1.8.2 Monoklonale Antikörper

Ziege-anti- Kaninchen IgG (H+L), PO-gekoppelt

Dianova, Hamburg

Ziege-anti-Maus IgG (H+L), PO-gekoppelt

Dianova, Hamburg

Kaninchen-anti-Maus IgG, FITC-konjugiert

Dianova, Hamburg

Kaninchen-anti-Rind IgG, FITC-konjugiert

Dianova, Hamburg

mAk anti-His₄

Qiagen, Hilden

mAk anti-His₅

Qiagen, Hilden

2.1.9 Bakterienstämme und Bakteriophagen

E. coli XL 1-Blue

Stratagene, La Jolla, CA, USA

E. coli W 6

E. coli Nm 537

R408

Stratagene, La Jolla, CA, USA

2.1.10 Plasmide

pACYC177

NEB, Frankfurt/M.

pBluescript II-SK/KS

Stratagene, La Jolla, CA, USA

pCITE2a,b,c

AGS, Heidelberg

pEGFP-N3

Clontech, Palo Alto, CA, USA

pEX-System (BFAV)	basiert auf dem am EMBL entwickelten System (Strebel et al., 1986)
pQE-30 / 31 / 32	Qiagen, Hilden
RHDV-cDNA-Klone	PD Dr. G. Meyers, BFAV

2.1.11 Zellen und Virusstämme

2.1.11.1 Zellen

CRFK (Crandell Reese Feline Kidney): American Type Culture Collection (ATCC CCL 94)

BHK-21 (Baby Hamster Kidney Zellen), erhalten von T. Rümenapf (Universität Giessen)

2.1.11.2 Virusstämme

FCV 2024: 1968 isoliert von R.C. Povey, erhalten von Hoechst Roussel Vet GmbH

Rekombinantes Vacciniavirus vTF7-3 (Fuerst et al., 1986): zur Verfügung gestellt von Dr. B. Moss, National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA

Rekombinantes Vacciniavirus, Stamm Ankara, modifiziert, T7-Polymerase exprimierend (MVA-T7) erhalten von Dr. B. Moss

2.1.12 Zellkulturmedien

BFA-35 (Trypsinlösung):

8,0 g/l	NaCl	2,5 g/l	Trypsin 1:300
0,2 g/l	KCl	1,23 g/l	DTA Na ₂ x 2 H ₂ O
1,44 g/l	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	0,016 g/	Phenolrot
0,2 g/l	KH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O		

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

Aminosäuren:		Vitamine:	
0,0178 g/l	L-Alanin	0,1 mg/l	Biotin
0,03 g/l	L-Asparaginsäure	0,025 g/l	Hypoxanthin
0,07 g/l	Glycin		
0,075 g/l	L-Glutaminsäure	3,7 g/l	NaHCO ₃
0,025 g/l	L-Prolin		

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

DMEM, -Cys, -Met

Gibco BRL

2.1.13 Stammlösungen und Medien

Acridinorange-Stammlösung:
10 mg/ml in 1 x PBS

Acridinorange-Arbeitslösung:
Stammlösung 1 : 300 in
1x Phosphatpuffer

Ampicillin-Lösung (1.000x Stock):
100 mg/ml in H₂O
sterilfiltriert Lagerung bei -20 °C

APS-Lösung:
10 % (w/v) APS in H₂O
aliquotieren, Lagerung bei -20 °C

Chloramphenicol-Lösung (2.700x Stock):
68 mg/ml in Ethanol
sterilfiltriert Lagerung bei -20 °C

Coomassie-Lösung:
0,1 % Coomassie Brilliant Blue in
Fixierer

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

Ethidiumbromid-Lösung:
10 mg/ml

Fixier-Lösung für PAGE:
30 % Methanol
10 % Essigsäure

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

Kristallviolett-Lösung:
1 % Kristallviolett
50 % Ethanol

Lämmli-Elektroden-Puffer (10x):
1,92 M Glycin
0,25 M Tris
10 % SDS
pH 8,3 vor SDS-Zugabe mit HCl

Luria Bertrani (LB)-Agar:
LB-Medium + 1,5 % (w/v) Agar

Luria Bertrani (LB)-Medium:
1,0 % Bacto-Trypton 10 g/l
0,5 % NaCl (w/v) 5 g/l
0,5 % Hefeextrakt (w/v) 5 g/l
pH 7,3 mit Natronlauge

LB⁺⁺-Medium:
10 mM KCl
20 mM MgSO₄
in LB-Medium

Ligase-Puffer (10x):
500 mM Tris-HCl, pH 7,5
70 mM MgCl₂
10 mM DTT

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

Phenol:
mit TE gesättigte Phenollösung mit
0,1 % Hydroxychinolin

Phosphatpuffer (50x):
250 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O
250 mM NaH₂PO₄ x H₂O
pH mit NaOH auf 6,8-7 einstellen

Polynukleotidkinase-Puffer (10x):
700 mM Tris-HCl, pH 7,6
100 mM MgCl₂
50 mM DTT

Probenpuffer f. DNA-Agarose-Gele (10x):
20 mM EDTA, pH 8,0
50 % Glycerol
0,2 % Orange G
0,2 % Xylencyanol
0,1 % Bromphenolblau

Probenpuffer für DNA-Sequenzgele, 1 x :

80 % Formamid
20 % BlueDextran/ EDTA

Probenpuffer für PAGE, 1 x :

6 M Harnstoff
62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8
20 % β -Mercaptoethanol
10 % Glycerin
2 % SDS
0,01 % Bromphenolblau
0,01 % Phenolrot

RNaseA-Lösung:

10 mg/ml RNaseA in 1 x TE
aliquotiert nach mehrmaligem Erhitzen und Abkühlen

SSC (20x):

3 M NaCl
0,3 M $\text{Na}_3\text{Citrat} \times 2 \text{H}_2\text{O}$
mit NaOH auf pH 7,0

TAE-Puffer (50x) :

2 M Tris
250 mM Natriumacetat
50 mM Na_2EDTA
pH 7,8 mit Essigsäure

TBE-Puffer (10x):

500 mM Tris-HCl, pH 8,3
500 mM Borat
20 mM EDTA

TE-Puffer (10x):

100 mM Tris-HCl, pH 7,5
10 mM EDTA

Tetracyclin (500x stock):

50 mg/ml in 70 % Ethanol
Lagerung in Aliquots bei -20°C

Translations-Reaktionsgemisch, 12,5 x
(Boehringer Mannheim):

je 312,5 μM Aminosäuren (ohne Met)
37,5 mM Fructose-1,6-bisphosphat
30,0 mM cAMP
12,5 mM dATP
2,5 mM dGTP
100 mM Creatinphosphat
250 mM Hepes, pH 7,6

Transkriptionspuffer (5x)

300 mM Tris-HCl, pH 7,5
30 mM MgCl_2
50 mM NaCl
10 mM Spermidin

2.2 Methoden

2.2.1 Gewebekultur

CRFK- und BHK21-Zellen wurden in BFA-34T Medium mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) bei 37°C und 7% CO₂ in feuchter Atmosphäre kultiviert. Die am Boden der Gewebekulturschale anhaftende Zellen wurden alle 3-4 Tage (bei Erreichen eines konfluenten Zellrasens) durch Trypsinbehandlung abgelöst und in geeigneten Verdünnungen (CRFK 1:5, BHK-21 1:8) in neue Gewebekulturschalen eingesät und weiter passagiert.

2.2.1.1 Infektion von CRFK-Zellen

CRFK-Zellen wurden in der Regel am Vortag der Infektion so eingesät, daß zum Zeitpunkt der Infektion ein Zellrasen mit ca. 80% Dichte erhalten wurde. Die Infektion der Zellen erfolgte bei 37°C in 20% des normalen Kulturvolumens bei einer m.o.i. von 0,01-1 in BFA-34T. Nach einstündiger Inkubation wurde der Überstand abgenommen, neues Medium mit FCS zugegeben und der Ansatz 6 bis 48 h im Brutschrank stehengelassen. Die mit cytopathogenen Viren infizierten Zellen wurden nach Auftreten des cytopathogenen Effektes geerntet, aliquotiert und bei -70°C gelagert.

2.2.1.2 Bestimmung der Zahl lebender Zellen

Zur Bestimmung der Zahl lebender CRFK-Zellen wurden diese mit Trypsin 5-8 min im Brutschrank inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen vom Boden der Gewebekulturschale erfolgte die Resuspension der Zellen mit einer Glaspipette bis einzelne Zellen vorlagen. Durch Zugabe des doppelten Volumens an FCS-haltigem Medium wurde die Trypsinbehandlung gestoppt. Zur Bestimmung der Zahl an lebenden Zellen wurde die Zellsuspension 1:10 in Erythrosin B (1 mg/ml in PBS) verdünnt. Im Gegensatz zu lebenden Zellen nehmen tote Zellen das Erythrosin B auf und färben sich dadurch rötlich. In einer Fuchs-Rosenthal Zählkammer wurden die in 4 diagonalen Quadranten befindlichen nicht angefärbten Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Berechnung der Zellzahl (in Zellen/ml) erfolgte mittels folgender Formel:

$$\text{Zellzahl} \times 4 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 0,35 \times 10^3.$$

2.2.1.3 Titration von FCV-Viren und Titerberechnung

Die Endpunkttitrations von Viren erfolgten in 96-well-Platten. Pro „well“ wurden zunächst $1,75 \times 10^4$ CRFK-Zellen in 100 µl FCS-haltiges Medium vorgelegt. Je Titrationsreihe wurde

mit 100 µl des Virusstocks begonnen. Die Titration wurde in Doppelbestimmungen durchgeführt und erfolgte in Verdünnungsstufen von 1:10 mit Hilfe einer Multikanalpipette. Zu den Zellen wurde jeweils genau 100 µl Virusverdünnung zugegeben und der Ansatz für bis zu 5 Tage im Brutschrank inkubiert. Die Auswertung der Titration erfolgte bei diesen cp-Viren über die Identifikation von Plaques bzw. die vollständige Zerstörung aller Zellen in der entsprechenden Kammer. Der Fortschritt des cpe wurde täglich verfolgt. Der Titer, bezogen auf einen Milliliter, wurde wie folgt berechnet:

Reziproker Wert der letzten positiven Verdünnungsstufe x 10.

Dabei wurde für jeden Virusstock der Mittelwert aus beiden Titrationsreihen ermittelt.

2.2.1.4 Indirekte Immunfluoreszenz

Zum spezifischen Nachweis einer FCV-Infektion von Kulturzellen wurde die indirekte Immunfluoreszenz mit FCV-spezifischem polyklonalem Serum durchgeführt. Dazu wurde das Gewebekulturmedium abgenommen und der Zellrasen dreimal mit PBS gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte mit Aceton/Methanol (1:1) für 15 min bei -20°C. Danach wurden die Zellen im kalten Luftstrom getrocknet (in dieser Form bei -20°C lagerbar). Nach Rehydrierung des Zellrasens mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper (polyklonales anti-FCV-Serum 1:160 in PBS verdünnt) für mindestens 1 h bei 37°C. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 1 h bei 37°C mit dem zweiten Antikörper (anti-Spezies IgG-Antikörper, FITC-konjugiert; 1:150 in PBS) inkubiert. Die Zellen wurden erneut dreimal mit PBS gewaschen und im Fluoreszenzmikroskop beurteilt.

Zu Kontrollzwecken erfolgte auch die Transfektion von BHK-21 Zellen mit Expressionsplasmiden für das E0 des CSFV. Dabei erfolgte der Nachweis des viralen Proteins mit einem spezifischen mAk (2416; Weiland et al., 1992) als 1. Ak aus der Maus und entsprechend einm FITC-Konjugat anti-Maus als zweitem Antikörper.

2.2.1.5 Peroxidase-Färbung

Die Peroxidase-(PO)-Färbung lief in den ersten Schritten wie die indirekte Immunfluoreszenz ab. Auch bei dieser Methode wurden die Zellen mit Aceton/Methanol fixiert und konnten nach dem Trocknen bei -20°C gelagert werden. Die Rehydrierung erfolgte mit PBS wie oben dargestellt. Das Dekorieren mit dem ersten Antikörper war ebenfalls in allen Belangen vergleichbar, ebenso wie die folgenden Waschschritte. Als zweiter Antikörper wurde dann aber ein speziesspezifischer Antikörper verwendet, an den die Peroxidase kovalent gekoppelt vorlag. Auch nach diesem Schritt wurde wie üblich mit PBS gewaschen. Die Farbreaktion erfolgte

te durch Inkubation mit einem Puffer für 5-15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Die Färbelösung bestand aus 50 mM NaAc, pH 5,0; 5 % AEC (Aminoethylcarbazol) und 0,03 % H₂O₂ in Wasser. Die gefärbten Zellen stellten sich (dunkel-)braun vor einem hellen oder bräunlichen Hintergrund dar. Die Färbung wurde beendet, indem man die Lösung abnahm und die Zellkulturschalen mit fließendem kaltem Wasser abspülte. Bei Raumtemperatur wurden die Schalen im Dunkeln getrocknet. Nach Überschichtung mit Glycerin/H₂O (1:1) waren die Schalen über Wochen bei 4°C lagerbar. AEC ist kanzerogen und giftig, die entsprechenden Lösungen wurden in 5 % Hypochlorid-Lösung entsorgt.

2.2.1.6 Metabolische Markierung von FCV-Proteinen in CRFK-Zellen

Die Zellen einer 3,5 cm Kulturschale wurden 1,5 h bis 4 h nach der Virusinfektion dreimal mit Markierungsmedium gewaschen. In diesem Markierungsmedium fehlen die Aminosäuren Methionin und Cystein. Die metabolische Markierung der Proteine erfolgte mit 125 µCi [³⁵S] Methionin/[³⁵S] Cystein ([³⁵S] Trans-Label) in 500 µl Markierungsmedium. Nach weiteren 4-6 h wurde das radioaktive Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Bis zur Extraktion der Antigene für die Radioimmunpräzipitation wurden die Zellen bei -70°C eingefroren.

2.2.1.7 Transfektion von CRFK-Zellen mit RNA

Die Transfektion von CRFK-Zellen mit RNA erfolgte mit Hilfe des Lipofectin-Reagenz. Dabei handelt sich um das Gemisch zweier kationischer Lipide, die mit Nukleinsäuren spontan Lipid-Nukleinsäure-Komplexe in Form von Liposomen ausbilden (Felgner et al., 1987). Diese Liposomen fusionieren mit den Zellen und bewirken so die Aufnahme der Nukleinsäuren. Diese Methode hat sich bereits für DNA, RNA und Oligonukleotide bewährt (Malone et al., 1989, Chiang et al., 1991). Das System ist für eukaryontische Zellen inklusive Pflanzenprotoplasten etabliert. Das Verhältnis von Nukleinsäure zu Reagenz und die Zelldichte für optimale Ergebnisse sind dabei allerdings vom Zelltyp abhängig.

Zur Erzielung optimaler Transfektionsergebnisse wurden die Zellen am Vortag so umgesetzt, dass sie zur Transfektion 50 – 60 % konfluent waren. Die Angaben beziehen sich auf den Ansatz für eine 35-mm-Schale. Eingesetzt wurden je 1-4 µg RNA bzw. 4 µl eines *in vitro* Transkriptionsansatzes. Im Übrigen wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren. Um cytopathogene Effekte durch das Transfektionsreagenz zu vermeiden, wurde der Ansatz nach 4-6 h abgenommen und durch Medium mit FCS ersetzt, da sonst die Auswertung erschwert worden wäre.

2.2.1.8 Kristallviolett-färbung

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

2.2.2 Transiente Expression viraler Proteine im T7-Vacciniavirus-System

Die Transfektion wurde mit dem „SuperFect Transfection reagent“ durchgeführt. Am Vortag umgesetzte CRFK- oder BHK-Zellen (3,5 cm Schale, 80% konfluent) wurden einmal mit BFA-34T Medium ohne FCS gewaschen und mit einer der beiden T7-Vacciniavirus-Varianten (vTF7-3, MVA-T7) mit einer m.o.i. von 5 infiziert. Während der einstündigen Inkubation bei 37 °C mit 7 % CO₂ wurden die DNA-Proben für die Transfektion vorbereitet. Hierzu wurden 4 µg Plasmid-DNA in 75 µl BFA-34T ohne FCS mit 10 µl SuperFect-Reagenz vermischt und 5-10 min bei RT inkubiert. In dieser Zeit werden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Danach wurden 600 µl Medium mit FCS zum Transfektionsansatz zugegeben, gemischt und der Ansatz in die entsprechende Gewebekulturschale gegeben. Nach 4 h Inkubation bei 37°C wurde der Transfektionsansatz verworfen und die Zellen mit 1,5 ml BFA-34T mit FCS bedeckt und für weitere 12-24 h inkubiert. Falls die direkte Auswertung über das Auftreten eines cpe oder die Expression eines Marker (Immunfluoreszenz) nicht möglich war, wurde radioaktiv markiert.

2.2.2.1 Radioaktive *in vivo* Markierung transient transfizierter Zellen

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

2.2.3 Mikrobiologische Methoden

2.2.3.1 Anzucht von Bakterien

Sämtliche Bakterienstämme wurden bei 37 °C unter Schütteln (175 UpM) in LB-Medium angezogen. Die Selektion plasmidhaltiger Bakterien erfolgte durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums. (100 mg Ampicillin / Liter Medium; 25 mg Kan/l; 25 mg Cam/l).

2.2.3.2 Dauerkulturen

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

2.2.3.3 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

CaCl ₂ -Lösung:	60 mM CaCl ₂	(1 M Stammlösung, autoklaviert)
	15 % Glycerin	(87 % Stammlösung, autoklaviert)
	10 mM PIPES, pH 7,1	(0,5 M Stammlösung, steril filtriert)

Unter bakterieller Transformationskompetenz versteht man die Fähigkeit von Bakterienzellen, Fremd-DNA aufzunehmen. Hierfür ist es notwendig, dass die Zellwand der Bakterien für die DNA-Moleküle durchlässig gemacht wird. Dies kann durch Behandlung der Zellen mit Kalziumchlorid geschehen.

Von einer entsprechenden Agarplatte mit dem gewünschten Stamm bzw. aus einer Dauerkultur wurde eine Vorkultur in LB-Medium angeimpft und über Nacht inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde dann morgens auf eine OD von 0,05-0,1 die Hauptkultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert und das Wachstum über die OD₆₀₀ regelmäßig verfolgt. Die *E. coli* Zellen wuchsen bis zu einer OD₆₀₀ = 0,6 und wurden dann bei 4°C abzentrifugiert (10 min, 3000 UpM, Minifuge GL). Die Bakterien wurden in 1/4 des Ausgangsvolumens eiskalter CaCl₂-Lösung resuspendiert und 40 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden erneut wie oben beschrieben abzentrifugiert, in 1/20 des Ausgangsvolumens in eiskalter CaCl₂-Lösung resuspendiert und erneut 1-3 h auf Eis inkubiert. Die nun transformationskompetenten Bakterien wurden in Aliquots bis zur Verwendung bei -70°C gelagert.

2.2.3.4 Hitzeschock-Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien

Zur Transformation wurde der Ligationsansatz bzw. 10-50 ng Plasmid-DNA zu 50 µl kompetenten *E. coli* Bakterien gegeben und 20 min auf Eis inkubiert. Nach Durchführung eines Hitze-/Kälteschocks (2 min 42°C, 1 min auf Eis) erfolgte die Zugabe von 200 µl LB⁺⁺-Medium. Anschließend wurde der Ansatz 40-50 min bei 37°C inkubiert, danach auf einer LB-Agarplatte mit dem gewünschten Selektions-Antibiotikum ausplattiert und 12-16 h bei 37°C inkubiert. Die entstandenen Kolonien wurden zum Animpfen von „Minipreps“ verwendet.

2.2.3.5 Plasmidpräparation für Test-/Kontrollzwecke („Miniprep“)

Lösung I:

50 mM Tris-HCl, pH 8,0
10 mM EDTA
50 mM Glukose

Lösung II:

0,2 M NaOH

Lösung III:

3 M NaAc, pH 4,8
1 % Triton X-100

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim, 1979). 1,5 ml einer 4 ml Übernachtskultur der zu testenden Bakterienklone wurden 5 min bei 5.000 UpM (Eppendorf-Zentrifuge) abzentrifugiert. Die pelletierten Bakterien wurden in 100 µl Lösung I resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Lösung II zugegeben, der Ansatz durch kurzes Vortexen gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Neutralisation mit 150 µl Lösung III für 10 min auf Eis und das Pelletieren der Proteine sowie der chromosomalen DNA (10 min, 14.000 UpM). Der plasmidhaltige Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die Plasmid-DNA mit 400 µl Isopropanol 5 min gefällt. Die Plasmid-DNA wurde abzentrifugiert (5 min, 14.000 UpM), einmal mit 200 µl Isopropanol gewaschen und in der „Speed Vac“ getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 50 µl H₂O, das 250 ng RNaseA enthält, aufgenommen und durch Schütteln gelöst. Für die Spaltung mit Restriktionsendonukleasen wurden 1,5 µl der DNA-Lösung in einem 10 µl Ansatz mit der gewünschten Endonuklease für 30-60 min verdaut und auf einem Agarosegel aufgetrennt.

2.2.3.6 Plasmidpräparation zur Gewinnung großer DNA-Mengen („Midipreps“)

Lösung E1:	Lösung E2:	Lösung E3:
50 mM Tris-HCl	0,2 M NaOH	3,1 M KAc
10 mM EDTA	1 % SDS (w/v)	pH 5,5 (Essigsäure)
100 µg/ml RNase A		
pH 8,0		
Lösung E4:	Lösung E5:	Lösung E6:
0,6 M NaCl	0,8 M NaCl	1,25 M NaCl
0,1 M NaAc	15 % EtOH	0,1 M Tris-HCl
0,15 % Triton X-100	pH 5,5 mit Essigsäure	pH 8,5
pH 5,0 mit Essigsäure		

Größere Plasmidpräparationen wurden mit dem „JETstar-Kit“ durchgeführt. 100 ml einer Übernachtskultur (mit 25 µl einer „Miniprep“ Startkultur angeimpft) für low-copy-Plasmide und 50 ml für High-copy-Plasmide wurden 15 min bei 5.000 UpM (Minifuge RF) in 50-ml-„Greiner-Röhrchen“ pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 4 ml kalter Lösung E1 resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml E2 wurde der Ansatz durch vorsichtiges, mehrmaliges Invertieren des Röhrchens gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 4 ml Lösung E3. Der Ansatz wurde erneut vorsichtig gemischt. Durch eine zwanzigminütige Zentrifugation bei 5.000 UpM (Minifuge RF) wurden die denaturierten Proteine und die chromosomale DNA abgetrennt. Der Überstand wurde auf die vorher mit 10 ml E4 äquilibrierte Säule pipettiert. Nachdem der Überstand vollständig durchgelaufen war, wurde zweimal mit je 10 ml E5 gewaschen und schließlich die DNA mit 5 ml E6 von der Säule eluiert. Durch Zugabe des 0,7-fachen Volumens Isopropanol und einer Inkubation von 5 min bei RT erfolgte die Fällung der DNA. Anschließend wurde die DNA durch Zentrifugation bei 7.000 UpM in Corex-Röhrchen pelletiert (Rotor JS13.1), getrocknet und in 400 µl 0,3 M NaAc, pH 7,0 aufgenommen. Nach Zugabe des 2,5-fachen Volumens absolutem EtOH erfolgte eine erneute Fällung für 30 min bei -70 °C. Die DNA wurde 15 min bei 4 °C abzentrifugiert, einmal mit 70% EtOH gewaschen und in 50 µl H₂O aufgenommen.

Alternativ wurde auch der Nucleobond AX-Kit verwendet, der sowohl dem Reinigungsprinzip nach als auch bezüglich der Ausbeuten vergleichbar war.

2.2.4. Spektrophotometrische Analyse von Nukleinsäuren

Die Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren wurde anhand des UV-Spektrums der DNA- oder RNA-Proben ermittelt (Sambrook et al., 1989). Dabei wurden in 100 µl Volumen am Spektrophotometer in Quarz-Küvetten Verdünnungen (meist 1:100) der Proben in Wasser gegen Wasser als Nullwert bei den Wellenlängen 260 / 280 nm gemessen. Die Konzentration von Nukleinsäure-Lösungen errechnet sich aus der Extinktion der Lösung bei 260 nm. Eine Extinktion_{260 nm} von 1,0 entspricht bei einer Schichtdicke von 1 cm nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz einer Konzentration von

50 µg/ ml bei doppelsträngiger DNA

33 µg/ ml bei einzelsträngiger DNA

40 µg/ ml bei einzelsträngiger RNA.

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

1,8 - 2,0 bei reiner DNA

1,9 - 2,1 bei reiner RNA.

2.2.5 Methoden zur Isolierung und Analyse von RNA

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

2.2.5.1 Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Behandlung von Lösungen

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

2.2.5.2 RNA-Isolierung aus Zellen

RNA-Lysis-Mix:

4 M Guanidiniumisothiocyanat

0,5 % Lauryl-Sarcosinat

25 mM Lithiumcitrat

0,1 M β-Mercaptoethanol

CsCl-Lösung:

5,7 M CsCl

10 mM Tris-HCl, pH 7,0

Das Kulturmedium der Zellen einer 8,5 cm Kulturschale wurde verworfen und die Zellen in 6 ml RNA-Lysis-Mix resuspendiert, wodurch eine Zelllyse und eine Inaktivierung von RNasen erreicht wurde (Chirgwin et al., 1979). Die Zellsuspension wurde in einem Polyallomer-Röhrchen auf ein 4,5 ml CsCl-Kissen geschichtet und für 21 h bei 32.000 UpM und 20°C im

SW41-Rotor zentrifugiert. Aufgrund ihres hohen spezifischen Gewichtes ($> 1,8 \text{ g/ml}$) wird die RNA pelletiert, während die anderen zellulären Komponenten (DNA, Lipide, Proteine) im Überstand bleiben. Nach Beendigung der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen, das Zentrifugenröhrchen auf den Kopf gestellt und der Boden mit einem heißen Skalpell abgeschnitten. Die RNA wurde in $320 \mu\text{l H}_2\text{O}$ gelöst und durch Zugabe von $40 \mu\text{l 2 M KAc}$, pH 5,6 und $800 \mu\text{l}$ absolutem EtOH für 30 min bei -70°C gefällt. Nach einmaligem Waschen mit 80% EtOH wurde die RNA in H_2O gelöst. Die Lagerung der RNA-Lösung erfolgte bei -20°C .

2.2.5.3 RNA-Agarosegelelektrophorese

Zur Vermeidung intramolekularer Rückfaltungen der RNA und damit verbundenem verändertem Laufverhalten im Agarosegel wurde die RNA vor dem Auftragen mit Glyoxal behandelt (Carmichael und McMaster, 1980) und ein formaldehyd-haltiges Agarosegel verwendet (Keil et al., 1984).

1-5 μg Gesamtzell-RNA oder 3 μl aus dem *in vitro* Transkriptionsansatz wurden mit 3 μl 5x Phosphatpuffer und 1,8 μl 40% Glyoxal in einem Gesamtansatz von 12,3 μl für 35-45 min bei 56°C denaturiert und anschließend mit 3 μl Probenpuffer versetzt. Für die Herstellung eines 1%igen Agarosegels wurden 1,5 g Agarose mit 140 ml H_2O im Mikrowellengerät aufgekocht. Unter Rühren erfolgte die Zugabe von 3 ml 50 x Phosphatpuffer. Nach Abkühlen auf 60°C wurden 21 ml einer 36,5%igen Formaldehydlösung zugegeben und das Gel gegossen (Horizontalgel der Größe 14 x 25 cm). Nach Zugabe von 1 x Phosphatpuffer in die Kammer wurden die Geltaschen mit den denaturierten Proben beladen. Die Auftrennung der RNA erfolgte bei einer Spannung von 4 V/cm mit ständiger Pufferumwälzung für 4 h. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel 5-10 min in einer Acridinorangelösung gefärbt und anschließend 3 x 15 min in 1 x Phosphatpuffer entfärbt. Die denaturierte RNA wurde im UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht, und das Gel mit einer Polaroid-Kamera fotografiert.

2.2.5.4 Northern-Blot

2.2.5.4.1 Transfer von RNA auf Filter

Im Anschluß an die Färbung des RNA-Gels erfolgte der Transfer auf die N^+ -Nylonmembran. Dazu wurde eine Gelgiesskammer mit der offenen Seite nach unten in eine große Wanne gestellt, die etwa 1 cm hoch mit Transferpuffer (20 x SSC) gefüllt war. Auf die Gelkammer wurden zwei Lagen mit 20 x SSC befeuchtetes Filterpapier (Whatman 3MM) gelegt, dessen Länge so bemessen war, daß die Enden des Filterpapiers in die Transferlösung tauchten. Das Gel wurde mit den Taschen nach oben auf das Filterpapier gelegt. Als nächste folgten der

genau gelgroße Nylonfilter und zwei gleich große Filterpapiere, die mit 20 x SSC angefeuchtet waren. Anschließend wurde ein Stoß trockenes, saugfähiges Papier aufgelegt und mit einem Gewicht (ca. 1 kg) beschwert. Über die Kapillarkräfte des Papiers wurde die Transferlösung durch das Gel gesaugt und die RNA auf die Nylonmembran transferiert (Sambrook et al., 1989). Das Gel wurde mindestens 12 h „geblottet“. Nach dem Transfer wurde die „RNA-Leiter“ auf der Membran unter einer UV-Lampe (254 nm) sichtbar gemacht und mit einem Kugelschreiber markiert. Zur Zerstörung des Glyoxal, das die Hybridisierung beeinträchtigt, und zur Fixierung der RNA auf der Membran wurde diese für 3-4 h bei 80 °C im Vakuum gebacken.

2.2.5.4.2 RNA / DNA-Hybridisierung

Hybridisierungslösung:

1 mM	EDTA
0,25 M	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
0,25 M	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O
7 %	SDS

5% Hybridisierungswaschlösung:

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

1% Hybridisierungswaschlösung:

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

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

2.2.5.5 cDNA-Bibliothek

Für die Erstellung einer cDNA-Bibliothek von FCV wurde RNA eingesetzt, die aus Virionen stammte, die über einen CsCl-Gradienten gereinigt worden waren. Für die Synthese des 1. Stranges wurde die Reverse Transkriptase „SuperScript II“ verwendet. In 23,4 µl Volumen wurden 4,15 µg RNA mit 1 µg Oligo-dT als Primer 5 min bei 70°C und 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 8 µl 5x-RT-Puffer (150 mM KCl, 40 mM MgCl₂, je 5 mM dNTP, 250 mM Tris/HCl, pH 8,0), 1 µl RNase-Inhibitor und 4 µl DTT (0,1 M) zugegeben und 20 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden 1,6 µl dNTPs (25 mM) und 1 µl Reverse Transkriptase (200 u) zugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Über einen radioaktiven Test wurde die Synthese des 1. Stranges kontrolliert (Meyers 1990). Der zweite Strang wurde mit dem Pharmacia-cDNA-Synthese-Kit analog zur von Gubler beschriebenen Methode (Gubler und Hoffmann 1983) hergestellt. Nach dem Herstellerprotokoll erfolgte die Synthese des 2. Stranges, der RNA-Abbau und die Reinigung der cDNA, sowie die Ligation von Adaptoren für die Klonierung. Die entstandene cDNA wurde über Agarosegelelektrophorese analysiert und es wurde eine Größenselektion durchgeführt, um nur cDNAs in die Bibliothek aufzunehmen, die länger als 2,5 kb waren. Die cDNA wurde mit den λ-ZAPII-Phagenarmen ligiert und mit dem Gigapack-Kit verpackt. Entsprechend der Angaben des Herstellers des Verpackungsextraktes wurden die Phagen zur Infektion von XL-1 blue Bakterien (nach „Maltose-Induktion“) verwendet und ausplattiert. Die Anzahl der entstandenen Phagen wurde bestimmt (entspricht der Komplexität der cDNA-Bibliothek). Die Analyse der Klone erfolgte durch die Erstellung von Replikas auf Nylonmembranen und die Hybridisierung einer radioaktiven Sonde mit Phagen-DNA, die die gesuchten cDNA-Sequenzen enthielt. Positive Phagen-Plaques wurden isoliert, verdünnt und einem erneuten Hybridisierungstest unterworfen. Bei positiven Klonen wurde mit Hilfe des Helferphagen R408 eine sogenannte „*in vivo*“ Excision nach den Angaben des Herstellers des ZAPII-Phagensystems durchgeführt. Dabei werden als Endprodukt Bakterienklone erhalten, die die gesuchte cDNA in ein pBluescript-Plasmid inseriert enthalten. Die Bakterienklone wurden vermehrt und die Plasmid-DNA präpariert. Die gewonnene DNA wurde mit den Standardmethoden analysiert.

2.2.6 Standard DNA-Techniken

2.2.6.1 Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren

Phenol: Phenollösung, gesättigt mit 100 mM Tris-HCl, pH 7,5
0,1% Hydroxychinolin

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

2.2.6.2 Ethanol-fällung von DNA

Die DNA-Lösung wurde mit 1/10 Volumen einer 4 M LiCl-Lösung oder 3 M NaAc (pH 5,4) und dem 2,5fachen Volumen absolutem EtOH vermischt und für 30 min bei -70°C oder auf Trockeneis inkubiert. Anschließend wurde die DNA 15 min mit 14.000 UpM bei 4°C (Eppendorf-Zentrifuge) pelletiert. Zum Entfernen vorhandener Salzreste wurde die DNA mit 70% EtOH gewaschen, danach im Vakuum getrocknet und in H₂O gelöst.

2.2.6.3 Isopropanol-fällung von DNA

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

2.2.6.4 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Zur Analyse und Klonierung von Plasmid-DNA wurde diese mit Restriktionsendonukleasen des Typs II verdaut, die spezifische Sequenzen in doppelsträngiger DNA erkennen und spalten können. Die Spaltung von DNA erfolgte nach den Vorschriften der Lieferanten der entsprechenden Enzyme unter Verwendung der mitgelieferten Puffer. Dabei wurden DNA-Konzentrationen von 0,25 µg/ml nicht überschritten. Die Volumina betragen 10–15 µl für analytische Verdauung mit bis zu 0,3 µg DNA und 50 oder 100 µl für präparative Verdauung mit 1–5 µg DNA. Die Enzyme wurden mit 2–5 U für 30 min bis 5 h eingesetzt.

2.2.6.5 Herstellung glatter Enden an DNA-Molekülen

10 x Klenow-Puffer: 100 mM Tris-HCl, pH 8,5
 50 mM MgCl₂
 10 mM DTT

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

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

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

2.2.6.6 Dephosphorylierung von DNA

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

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

10 x Ligasepuffer: 500 mM Tris-HCl, pH 7,8 100 mM DTT
 100 mM MgCl₂ 10 mM ATP
 250 µg/ml BSA

Die T4-DNA-Ligase katalysiert mit Hilfe von ATP und Mg^{2+} -Ionen die Ausbildung einer kovalenten Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe und der 3'-Hydroxylgruppe von DNA-Molekülen. Für die Ligation wurden ungefähr 100-500 ng DNA pro Reaktionsansatz (30 μ l) in 1 x Ligationspuffer mit 3 U T4-DNA-Ligase versetzt. Die Ligation erfolgte entweder für 16 h bei 14°C oder für 4 h bei RT. Die molaren Verhältnisse der Ligationspartner (Insert : Plasmid) lagen bei 3 : 1 für die gerichtete Klonierung („sticky end“) und bei 5 : 1 für die Ligation glatter Enden („blunt end“).

2.2.6.8 DNA-Agarosegelelektrophorese

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

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden horizontale 0,6-1,5 % (w/v) Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer (mit 100 ng/ml EtBr) in der Mikrowelle durch Kochen gelöst und in die Horizontalgelapparaturen gegossen. Nach dem Erstarren wurde das Gel mit 1 x TAE (mit 100 ng/ml EtBr) überschichtet, die DNA-Proben mit 0,2-fachem Volumen Probenpuffer versetzt und aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 4-8 V/cm (i.d.R. 105 V konstant). Als Längenstandard wurde parallel zu den Proben ein kommerzieller Standard elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Gellauf konnten die DNA-Fragmente im UV-Licht (254/302 nm) sichtbar gemacht und fotografiert werden.

2.2.6.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA aus der Agarose erfolgte mit Hilfe des NucleoTrap Kits oder des QIAEX-Kits nach Angaben der Hersteller. Das Prinzip beider Kits beruht auf der Bindung von Nukleinsäuren an Glaspartikel (Vogelstein und Gillespie, 1979). Nach der Restriktionsenzymspaltung wurden die DNA-Fragmente im Agarosegel aufgetrennt, das gewünschte DNA-Fragment unter UV-Licht (302 nm) aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Eppendorfgeläß überführt. Nach Auflösung der Agarose in einer Lösung chaotroper Salze und Zugabe der Glaspartikelsuspension erfolgten mehrere Waschschrirte und die Ablösung der DNA vom Trägermaterial durch Inkubation in Wasser bzw. einem niedermolaren Tris-Puffer mit pH 7,5.

2.2.6.10 Radioaktive Markierung von DNA durch „Nick-Translation“

Zur radioaktiven Markierung durch „Nick-Translation“ werden durch das Enzym DNase I zufallsmässig offene Phosphodiesterbindungen („nicks“) in einem doppelsträngigen DNA-Molekül erzeugt. Mit Hilfe der 5'→3'-Exonukleaseaktivität der DNase I werden weitere Nukleotide entfernt und bei der Polymerasereaktion durch neue Nukleotide ersetzt. Da die

eingesetzten dCTP-Nukleotide an der α -Position [^{32}P]-markiert sind, wird die neu synthetisierte DNA radioaktiv markiert (Rigby et al., 1977). Die Markierungsreaktion wurde mit dem „Nick Translation Kit“ durchgeführt. Das zu markierende DNA-Fragment wurde aus einem Agarosegel eluiert. Maximal 50 ng des Fragmentes wurden mit 4 μl dNTP-Mix, 30 μCi α [^{32}P] dCTP und 2 μl Enzymlösung in einem Gesamtansatz von 20 μl für 60-90 min bei 15 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Durch Zugabe von 80 μl Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 5 mM EDTA, 0,5% SDS) wurde die Reaktion gestoppt und die freien Nukleotide durch Zentrifugation über eine Sephadex G-50 Säule abgetrennt. Die Messung der radioaktiven Markierung erfolgte im Mini-Assay Typ 6-20. Die Sonde wurde vor der Zugabe in die Hybridisierungslösung 3 min auf 95 $^{\circ}\text{C}$ erhitzt, um die DNA-Doppelstränge in Einzelstränge zu trennen.

2.2.6.11 Gelfiltration von Nukleinsäuren

Um einzelne Nukleotide von längeren Nukleinsäuremolekülen abzutrennen, wurde eine Gelfiltration durchgeführt. 1 ml Spritzen wurden mit 2 passend zugeschnittenen Glas-faserfiltern (Whatmann GF/C) abgedichtet und mit Sephadex G-50 (für Moleküle größer als 50 Nukleotide) bzw. Sephadex G-15 (für Oligonukleotide) gefüllt (Säulenmaterial in 1 x TE äquilibriert, autoklaviert). Das Gelbett wurde durch Zentrifugation im Ausschwingrotor 2 min verdichtet (2.000 UpM, Minifuge). Die Probe wurde in einem Gesamtvolumen von 100 μl auf die Säule aufgetragen und 2 min bei 2.000 UpM zentrifugiert. Der Säulendurchfluss wurde in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß aufgefangen.

2.2.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.2.7.1 Reverse Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

2,5x RT-Puffer R VIIIa:

125,0 mM	Tris, pH 8,3
187,5 mM	KCl
7,5 mM	MgCl ₂
25,0 mM	DTT
1,25 mM	dNTPs

5x PCR-Puffer R VIIIb:

25 mM	Tris, pH 8,3
100 mM	KCl
6,5 mM	MgCl ₂
1,25 mM	dNTPs
0,5 %	Triton X-100
0,1 %	BSA

Lagerung beider Puffer bei -20 $^{\circ}\text{C}$

RT-Mix:

8,0 μl	2,5x RT-Puffer R VIIIa
0,25 μl	RNasin (10 U)
0,25 μl	Reverse Transkriptase (50 U)

PCR-Mix (je Ansatz in 30 μl H₂O):

10 μl	5x PCR-Puffer R VIIIb
30 pM	Plusstrang-Primer
2 U	Taq-DNA-Polymerase

5 μg Gesamtzell-RNA und 30 pM Minusstrang Primer wurden gemischt und mit H₂O_{DEPC} auf ein Gesamtvolumen von 11,5 μl aufgefüllt. Der Ansatz wurde 3 min bei 94 $^{\circ}\text{C}$ denaturiert und

danach auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 8,5 µl RT-Mix erfolgte die reverse Transkription bei 37°C für 45 min. Durch 2-minütiges Erhitzen des Ansatzes auf 80°C wurde das RNA/DNA-Hybrid aufgeschmolzen, anschließend für 2 min auf RT abgekühlt und danach auf Eis gestellt. Pro Ansatz wurden dann 30 µl PCR-Mix zugegeben und die Polymerasekettenreaktion (PCR) gestartet. Standardansätze erfolgten z. B. mit folgenden Zyklusparametern:

Denaturierung:	94 °C, 30 sec
Annealing:	45-64°C, 30 sec
Elongation:	72 °C, 60 sec (abhängig von der erwarteten Fragmentgröße)
Zahl der Zyklen:	30-35

2.2.7.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Es wurden ca. 1-10 ng des DNA-Templates mit je 13 pMol Plus- und Minusstrang-Primer, 2,0 µl 10 x PCR-Puffer (Appligene), 1,6 µl dNTPs sowie 2 U Taq-Polymerase versetzt und auf ein Gesamtvolumen von 20 µl mit H₂O aufgefüllt. Die PCR wurde von Saiki et al., 1985 bzw. 1988 als Methode eingeführt. Für Standardansätze wurden die PCR-Parameter abgeschätzt mit den Annahmen, dass Taq-Polymerase etwa 1 kb je min synthetisiert und die Hybridisierungstemperatur der Primer mit der „2+4-Regel“ bestimmt werden kann.

2.2.8 Sequenzierung von DNA

2.2.8.1 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Für Sequenzierungen von Plasmid-DNA und PCR-Fragmenten wurde der „BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ von Perkin Elmer verwendet. Dabei handelt es sich um ein PCR-Kettenabbruch-System (Sanger et al., 1977), bei dem die zum Abbruch führenden Nukleotidderivate 4 verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe tragen (Smith et al., 1986). Somit ist die Analyse einer Sequenz auf einer Gelspur möglich. Zur Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde 1 µg DNA pro Ansatz verwendet, DNA aus (RT-)PCR-Ansätzen wurde gereinigt und dann 5 µl der jeweiligen gereinigten DNA eingesetzt.

Reaktionsansatz:	DNA
	3,6 pM Oligonukleotid-Primer
	3,0 µl Reaktionsmix BigDye-Kit
	ad 10 µl Aqua bidest

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

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

Der Reaktionsansatz wurde anschließend mit 25 µl Ethanol (100 %) und 1,1 µl NaAc (pH 5,4; 3 M) gemischt, vier Minuten bei RT gefällt, 20 Minuten mit 14.000 UpM zentrifugiert (Eppendorfzentrifuge), mit 150 µl Ethanol (75 %) gewaschen und getrocknet. Dieses getrocknete Pellet wurde bei -20°C gelagert bis zur Analyse auf einem Sequenzgel. Hierzu wurde die Probe in 3,5 µl Probenpuffer für DNA-Sequenzgele resuspendiert, drei Minuten bei 95°C denaturiert und 1,7 µl auf das Gel aufgetragen.

2.2.8.2. Elektrophorese von Sequenzreaktionen im Harnstoff-Acrylamid-Gel

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

Die Mischung wurde durch Nitrocellulose mit 0,2 µm Porendurchmesser filtriert und entgast, 310 µl APS (10 %) und 40 µl TEMED zupipettiert und das Sequenzgel zwischen den montierten Glasplatten gegossen. Nach Auspolymerisieren des Gels erfolgte der Einbau in die Apparatur mit 1 x TBE als Elektrophorese-Puffer.

Sobald beim Vorlauf (1.000 V, 50 W, 35 mA) eine Betriebstemperatur von 51°C erreicht war, wurden die Proben aufgetragen und der Hauptlauf gestartet (1.200 V, 150 W, 50 mA). Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte automatisch (Programm: DNA Sequencing Analysis Software, Version 2. 1.1).

2.2.9 Gerichtete Mutagenese

Die Mutagenesen wurden mittels PCR durchgeführt. Dazu wurde die DNA, die die fragliche Sequenz enthielt, für eine PCR eingesetzt, bei der die gewünschte Mutation über einen der Primer eingeführt wurde. Das PCR-Produkt wurde über eine Agarosegelelektrophorese oder mit dem NucleospinExtract-Kit gereinigt. Letztere Methode wurde nach der Herstellerbeschreibung angewendet, wenn nur das gewünschte Fragment amplifiziert wurde, also keine Nebenprodukte nachzuweisen waren. Das nun veränderte Fragment wurde in die Ausgangs-DNA zurückkloniert und die DNA in Bakterien transformiert. Das Vorhandensein der entsprechenden Mutation wurde durch Testspaltungen bzw. Sequenzierung von „Mini-Prep“-DNA überprüft.

Veränderungen, die auf dem oben beschriebenen Weg nicht zugänglich waren, erfolgten über die Einführung synthetischer, doppelsträngiger DNA. Dafür wurden Oligonukleotide eingesetzt, die zu einander komplementäre Sequenzen enthielten und nach dem Hybridisieren Einzelstrangüberhänge für ein einfaches Einsetzen in eine mit Restriktionsenzymen behandelte

DNA aufwiesen. Diese voll-synthetischen Sequenzen trugen dann die gewünschte Veränderung.

2.2.9.1 Phosphorylierung und Hybridisierung von Mutagenese-Oligonukleotiden

10 x PNKP:	700 mM	Tris-HCl, pH 7,6
	100 mM	MgCl ₂
	50 mM	DTT

In den Fällen, in denen über „gepaarte“ Oligonukleotide mutagenisiert wurde, erfolgte die Vorbereitung der komplementären Einzelstrang-DNAs in einem gemeinsamen Ansatz. Dabei wurden in einer Arbeitseinheit die 5'-Enden phosphoryliert und „klonierungsfähige“ Doppelstrang-DNA erzeugt.

1-2 nMol (1-2 µl des 1 mM Oligo-stocks) der für die jeweilige Mutagenese verwendeten Oligonukleotide wurden mit 3 U T4-Polynukleotidkinase und 1 µl ATP (100 mM) in 1 x Polynukleotidkinasepuffer (PNKP) in einem Gesamtvolumen von 50 µl für 30 min bei 37°C am 5'-Ende phosphoryliert. Anschließend erfolgte eine Gelfiltration über eine Sephadex G-15 Säule, um das überschüssige ATP zu entfernen und die Nukleinsäure-Lösung umzupuffern. Das Hybridisieren der beiden komplementären Oligonukleotide an einander erfolgte im Eluat der Gelfiltration. Hierzu wurde das ganze Eluat in ein Eppendorfgefäß pipettiert, in kochendes Wasser gestellt, bis zur Abkühlung auf ca. 25°C bei RT stehen gelassen und dann kurz auf Eis gestellt. Die so erzeugte 5'-phosphorylierte ds-DNA wurde die nach dem Standardprotokoll mit passend vorbereiteter DNA ligiert. Durch diesen Hitze-Schritt wurde auch das Enzym T4-PNK inaktiviert.

2.2.10 *In vitro* Transkription

5 x TS:	200 mM	Tris-HCl, pH 7,5	30 mM	MgCl ₂
	10 mM	Spermidin	50 mM	NaCl

4 µg Plasmid-DNA wurden am 3'-Ende durch einen Restriktionsenzymchnitt, der nicht zu überhängenden Enden führt, linearisiert und mit Phenol/Chloroform extrahiert. Für die Ethanol-fällung wurde die übliche Menge an EtOH aber 1/8 Volumen 2 M KAc, pH 5,6, statt des sonst verwendeten 1/10 Volumens 3 M NaAc zugesetzt. Die getrocknete DNA wurde in 10 µl H₂O_{DEPC} aufgenommen und für die *in vitro* Transkription mit der T7-RNA-Polymerase eingesetzt. In einem Gesamtansatz von 50 µl in 1 x Transkriptionspuffer wurden neben der linearisierten DNA 2,3 µg BSA (DNase und RNase frei), 0,5 µl 1M DTT, 15 U des RNase-Inhibitors RNasin, 50 U T7-RNA-Polymerase und 0,5 mM der einzelnen Nukleotide (ATP,

CTP, UTP, GTP) eingesetzt. Der Transkriptionsansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert. Bei Synthese von RNA mit 5'-„cap“-Struktur wurde 2,5 µl „cap“-Analog (NEB) zugegeben und nur 1/5 der normalen rGTP-Konzentration eingesetzt, zusätzlich wurde nach der 1 h nochmals 5 µl 10 mM rGTP zugegeben und weitere 15 min inkubiert. Da die transkribierten RNAs zur Transfektion in Zellen eingesetzt wurden, erfolgte anschließend eine Aufreinigung über eine Sephadex G-50 Säule. Nach Phenol-/Chloroformextraktion und Ethanolfällung wurde die getrocknete RNA in 20 µl H₂O_{DEPC} aufgenommen. Zum Test wurden 3,5 µl in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und nach Acridinorange-Färbung die Qualität der RNA bewertet. Für die Transfektion in CRFK-Zellen wurden 1,5-5 µl der transkribierten RNA eingesetzt.

2.2.11 *In vitro* Translation

Die *in vitro* Translation wurde mit dem „TNT T7 Coupled Reticulocyte Lysate System“ gemäß den Angaben des Herstellers (Promega) durchgeführt. Ausgehend von zirkulärer Plasmid-DNA erfolgt hierbei in einem 25 µl Reaktionsansatz sowohl die *in vitro* Transkription der RNA mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase als auch die *in vitro* Translation. Die radioaktive Markierung der translatierten Proteine erfolgte mit [³⁵S]-Methionin. Die Analyse erfolgte über PAGE.

2.2.12 Proteinanalytische Methoden

2.2.12.1 Radioimmunpräzipitation

RIP-Grundpuffer:	1% Triton (alt):	0,2% Triton:
20 mM Tris	1% Triton X-100	0,2% Triton X-100
100 mM NaCl	0,1% Desoxycholat	in RIP-Grundpuffer (-BSA)
1 mM EDTA	0,1% SDS	
2 mg/ml BSA	in RIP-Grundpuffer	25% Sucrose:
pH 7,6		25% Sucrose
	1 % Triton (neu):	1% Triton X-100
	s.o. nur Desoxycholat 0,5%	0,5% Desoxycholat
		0,1% SDS
		in RIP-Grundpuffer

Die radioaktiv markierten Zellen wurden in 500 µl 1% Triton (alt)-Puffer mit 2% SDS lysiert, 10 min bei 95°C inkubiert und danach 20 sec im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurde das Antigenmaterial zunächst bei 5.000 UpM in der Eppendorfzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand in Ultrazentrifugenröhrchen überführt. Die Pelletierung von unlöslichen Zellbestandteilen erfolgte für 60 min bei 45.000 UpM (TLA45-Rotor, TL100-Zentrifuge). Die Überstände wurden mit dem 4fachen Volumen an 1% Triton (alt)-Puffer verdünnt und die Radioaktivität eines 5 µl Aliquots mit 50 µl H₂O und 2 ml Szintillationsgemisch in einem Szintillationszähler bestimmt. Zu einer Probenmenge von 10⁶ cpm wurde der erste Antikörper (5 µl der Kaninchenserum, 5-8 µl der mAk, die nach Herstellerangaben vorbereitet waren) zugegeben. Nach je einstündiger Inkubation bei 37°C und 4°C erfolgte die Zugabe einer Staphylococcus aureus-ProteinA-Suspension (Kessler, 1981). Die Proben wurden danach für 30 min bei RT inkubiert und dabei alle 10 min geschüttelt. Anschließend wurden die Proben 30 min oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Über die Wechselwirkung zwischen dem Staphylococcus aureus Protein A und dem F_c-Teil der Antikörper kommt es zur Ausbildung von Proteinkomplexen, die durch Zentrifugation angereichert werden können. Durch Waschen werden die Bakterien-Protein-Komplexe von ungebundenem Protein und freien, markierten Aminosäuren getrennt. Dazu wurden die Präzipitate resuspendiert, mit einem Sucrose-Kissen (25 %, 500 µl) unterschichtet und pelletiert (25% Sucrose, 5 min, 4.500 UpM, Tischzentrifuge). Die Überstände wurden abgesaugt und die Präzipitate in 1 ml 1 % Triton (neu)-Puffer resuspendiert und bei 4.000 UpM (Eppendorf-Zentrifuge) für 4 min abzentrifugiert. Nach erneutem Waschen der Präzipitate mit 0,2% Triton-Puffer wurden die Pellets in 10 µl einer Mischung aus 3 ml 0,2% Triton und 7 ml H₂O aufgenommen. Nach Zugabe von 40 µl Probenpuffer mit 5 % β-Mercaptoethanol wurden die Proben für 3 min auf 95°C

erhitzt und 10 min bei 10.000 UpM (Eppendorf-Zentrifuge) zentrifugiert. Der Überstand mit den freigesetzten Proteinen wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die Radioaktivität von 5 µl Aliquots mit einem Szintillationszähler bestimmt. Entsprechend der Radioaktivitätsmenge wurde die Menge des Probenmaterials ermittelt, die dann in einer SDS-PAGE aufgetrennt wurde.

2.2.12.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE folgte der Anleitung von Schägger & von Jagow (1987).

Lösungen für Jagow-Gele:

Acrylamidlösung 30:1:	40% Acrylamid (w/v), 1,33 % N,N'-Methylenbisacrylamid (w/v)
Gelpuffer:	3,0 M Tris-HCl, pH 8,45; 0,3 % SDS (im Trenngel 1:3 verdünnt; im Sammelgel 1:4 verdünnt)
10 x Anodenpuffer:	2,0 M Tris-HCl, pH 8,9
10 x Kathodenpuffer:	1,0 M Tris, 1,0 M Tricin, 1 % SDS, pH 8,25

Die Glasplatten (18 cm x 16 cm) für die Proteingele wurden mit Aceton gereinigt und nach Einlage von zwei 1,5 mm „Spacern“ in die Gießvorrichtung (SE 6015, Hoefer Sci.) eingespannt. Anschließend wurde die Trenngellösung (10-12 % für Jagow-Gele i. d. R.) im Vakuum entgast, das Gel nach APS- und TEMED-Zugabe bis ca. 3,5 cm unter den oberen Rand der Glasplatten gegossen und mit H₂O überschichtet. Das Trenngel wurde 2-24 h nach dem Gießen mit einem 4%igen Sammelgel überschichtet und ein 15-Taschen-Kamm (für analytische Gele) bzw. ein Kamm für präparative Gele eingelegt (SE 511-15-1,5, Hoefer Sci.). Nach 30 min wurde der Kamm aus dem polymerisierten Sammelgel entfernt, die Geltaschen mehrfach mit H₂O und Kathodenpuffer gespült und anschließend die zuvor für 3 min auf 95 °C erhitzten Proben aufgetragen. Nach Überschichtung der Proben mit Kathodenpuffer wurde das Gel in die Vertikalapparatur eingespannt und 600 ml Kathodenpuffer in die obere Kammer (SE 6054, Hoefer Sci.) und 1,4 l Anodenpuffer in die untere Kammer (SE 6056) eingefüllt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei konstanter Spannung (45-55 V) über eine Dauer von 12-16 h. Als Molekulargewichtsstandards dienten [¹⁴C] radioaktiv markierte Proteine (N-terminale Methylierung).

2.2.12.3 Gelbehandlung und Fluorografie

Nach der Elektrophorese wurde das Gel 1 h in Fixierlösung mit Coomassie-Farbstoff und anschließend 1 h in En³hance-Lösung geschwenkt. Nach dreißigminütigem Wässern wurde das Gel auf Whatmann 3MM-Filterpapier getrocknet (2 h, 60°C). Die Exposition gegen Röntgenfilme erfolgte bei -70°C für variable Zeiträume.

Bei Versuchen, bei denen ausreichend starke Signale zu erwarten waren, wurde ohne En^3 hance gearbeitet. Dabei wurde nach der Fixierung das Gel mindestens 2,5 h in 3 % Glycerin / 20 % Methanol in Wasser geschwenkt und anschließend wie oben getrocknet und exponiert. Die Filme wurden in einer Entwicklermaschine automatisch entwickelt und getrocknet. Alternativ zur Filmentwicklung wurde gegen eine Phospho-Imager-Platte bei RT über Nacht oder für 1,5 Tage exponiert. Mit der Nutzung eines Phospho-Imagers bestand die Möglichkeit zur quantitativen Analyse der Banden / Signale.

Nach der Entwicklung der Röntgenfilme bzw. dem Auslesen der Phosphoimager-Platte auf dem Phosphoimager ist der Grad der Signalstärke (Schwärzung) proportional zur vorhandenen Proteinmenge.

2.2.13 RNA-Quantifizierung mittels Phospho-Imager Analyse

Ziel dieser Analyse war die Quantifizierung der genomischen FCV-RNA in der Gesamt-RNA infizierter Zellen. Dazu wurde die Stärke des Signals der genomischen RNA, das nach Northern Blot und Hybridisierung mit einer Sonde aus dem 5' Bereich des FCV-Genoms erhalten wurde, am Phosphoimager bestimmt. Dieses Ergebnis wurde mit der Signalstärke von *in vitro* transkribierter RNA verglichen. Für die *in vitro* transkribierte RNA wurde die Menge des Produktes mit genomischer Länge bestimmt. Hierzu wurde der Anteil des vollständigen Transkripts am Gesamtprodukt bestimmt (Quotient aus dem Signal der ca. 7,5 kb-Bande und dem Signal über die gesamte Spur des RNA-Gels). Die Signalstärke über die gesamte Spur konnte mit der photometrisch ermittelten RNA-Menge der *in vitro* Transkription korreliert werden.

In der praktischen Durchführung wurde die Membran mit der RNA nach der Hybridisierung mit der radioaktiven Sonde gegen eine Phosphoimager-Platte exponiert. Durch die Wahl der Sonde wurde gewährleistet, dass beim wt-FCV nur die genomische und nicht die subgenomische RNA detektiert wurde. Unter Verwendung eines Phosphoimagers wurde die exponierte Platte analysiert. Es ergab sich ein Bild, das dem auf einem Röntgenfilm entsprach, aber quantifizierbar war. Die so ermittelten Signale (einzelne Banden) wurden mit Hilfe des Programms Tina 2.0 ausgewertet. Eine direkte photometrische Messung der wt-FCV-RNA führt wegen des Vorhandenseins der subgenomischen RNA und der zellulären mRNAs hier nicht zum Ziel. Bei diesem Versuch wurde vorausgesetzt, dass die Hybridisierung der DNA-Sonde an die FCV-RNAs proportional zur vorhandenen RNA-Menge erfolgte und die Effizienz bei der Überführung vom Gel auf die Membran unabhängig von der Größe der RNAs war.

2.2.14 Expression und Analyse rekombinanter Proteine von Bakterien

Sonikations-Puffer:	1 M Harnstoff:	7 M Harnstoff:
300 mM NaCl	1,0 M Harnstoff	7,0 M Harnstoff
20 mM Imidazol	0,1 M Na-Phospat, pH 8	0,1 M Na-Phosphat, pH 8
50 mM Tris, pH 8	20 mM Imidazol, pH 8	20 mM Imidazol, pH 8

Zur Expression verschiedener viraler Proteine oder Virusproteinanteile mit einem His₆-„tag“ (Hochuli et al., 1987) am Aminoterminus wurde das pQE-System in *E. coli* XL1-Blue verwendet (Crowe et al., 1994). Eine effiziente Expression des rekombinanten Proteins erfolgt im pQE-System erst nach Induktion durch IPTG. IPTG bindet an den lac-Repressor, der daraufhin vom lac-Operator dissoziiert. Dadurch wird die Transkription vom T5-Promotor aus ermöglicht, der wiederum mit dem lac-Operator assoziiert ist.

Mit 5-15 ml über-Nacht-Kulturen der rekombinanten Klone wurden 200-500 ml LB-Amp-Medium angeimpft (1:50 bis 1:35) und bei 37°C und 200 UpM inkubiert, bis die Kultur eine OD₆₀₀ von 0,8 erreicht hatte.

Zur Induktion wurde IPTG für eine Endkonzentration von 1 mM zugegeben und weitere vier Stunden unter den gleichen Bedingungen inkubiert, bevor die Zellen durch Zentrifugation geerntet wurden.

Das Pellet wurde mit 1/10 Volumen Sonikationspuffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Auf dieser Stufe konnte das Bakterienpellet bei -20°C gelagert werden, falls sich die weitere Aufarbeitung nicht unmittelbar anschloss.

Das Bakterienpellet wurde mit 25 ml Sonikationspuffer, der 60 µl DNaseI (10 mg/ml), 250 µl Lysozym (25mg/ml) und 350 µl AEBSF (0,1 M in Isopropanol) bzw. 250 µl PMSF (0,1 M in Isopropanol) enthielt, resuspendiert. Es folgten 30 min Inkubation auf Eis und 3 min auf 37°C. Durch Beschallung (Ultraschall Stufe 6-7, 50% cycle, 3 min auf Eis) wurden die Bakterien aufgeschlossen. Nach weiteren 5 min Inkubation auf Eis wurde bei 11.500x g im JS 13.1-Rotor bei 4°C für 20-25 min zentrifugiert. Der Überstand wurde als lösliche Fraktion bei -20°C gelagert. Der Niederschlag wurde mit 25 ml 1 M Harnstoff (in 0,1 M Phosphatpuffer pH 8 mit 15 mM Imidazol) resuspendiert, beschallt, 30 min bei 37°C inkubiert und wie oben abzentrifugiert. Der Überstand bildete die 1 M Harnstoff-Fraktion. Der Niederschlag des zweiten Zentrifugationsschrittes wurde wie oben beschrieben extrahiert, aber mit 7 M Harnstoff (Puffer wie oben) behandelt. Nach gutem Resuspendieren, Inkubation und Zentrifugation war in der Regel kein Pellet mehr zu erkennen. Alle Fraktionen wurden im Western-Blot getestet. Die Fraktion mit dem Zielprotein – im Regelfall die 7 M Harnstoff-Fraktion – wurden an 2 ml Ni²⁺-NTA-Sepharose-Suspension (Vorbereitung lt. Herstellerprotokoll) im „batch“-Verfahren bei RT für 16 h unter leichtem Umschütteln gebunden, mit 7 M Harnstoff-

puffer gewaschen und mit 3,5 ml Elutionspuffer (7 M Harnstoffpuffer von oben, aber 250 mM Imidazol) eluiert.

Im Eluat wurde im Mikromaßstab die Protein-Konzentration mit dem Biorad Protein Assay nach dem Protokoll des Herstellers bestimmt (Bradford 1976).

Bei denjenigen Proteinen, mit denen im pQE-System keine Expression oder Reinigung möglich war, wurde das pEx-System (Strebel et al., 1986) verwendet. Dabei werden die Zielproteine als Fusionsproteine mit den N-terminalen 99 Aminosäuren der MS2-Polymerase exprimiert und in der Regel in Bakterien als „inclusion bodies“ „abgelegt“. Die Reinigung der Fusionsproteine durch Harnstoffextraktion erfolgte im Wesentlichen wie oben dargestellt. Die 7 M Harnstoff-Fraktion wurde mit einer präparativen PAGE weiter gereinigt (Wirblich 1995).

2.2.15 Protein-Elektroelution mittels Biotrap

Coomassie-gefärbte Proteine wurden aus Acrylamid-Gelen ausgeschnitten und in der Biotrap-Apparatur in 1x Lämmli-Elektroden-Puffer mit 1 % SDS über Nacht bei einer Spannung von 80 Volt nach Angaben des Herstellers aus dem Gel eluiert. Das Eluat wurde gesammelt. Da für die Verwendung als Immunisierungsproteine weder die Puffer-Bestandteile noch SDS stören, wurden die Proteine lediglich durch Zugabe von 7 M Harnstoff-Puffer auf eine Endkonzentration von etwa 2 M Harnstoff stabilisiert und anschließend lyophilisiert. Die Eluate wurden mittels denaturierender Jagow-Gele überprüft. Die Auswertung erfolgte nach Coomassie-Färbung und z.T. nach Western Blot-Analyse.

2.2.16 Western-Blot (Burnette 1981; Towbin et al., 1979)

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

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

Um unspezifische Bindungen zu blockieren, wurde die Membran etwa 1,5 h bei RT in PBS-T (PBS mit 0,1 % Tween 20) mit 2,5 % Magermilchpulver geschwenkt. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für zwei Stunden oder über Nacht mit dem ersten und ein bis zwei Stunden mit dem zweiten Antikörper in PBS-T. Nach jedem Antikörper wurde jeweils dreimal fünfzehn Minuten mit PBS-T gewaschen. Der zweite Antikörper war mit Pe-

roxidase (PO) gekoppelt. Bei PO-gekoppeltem Zweitantikörper wurde die Membran in einer 1:1:3-Mischung aus Supersignal 1 und 2 mit PBS-T drei Minuten geschwenkt, die Detektionslösung abgegossen und die Membran leicht mit einem Whatman-Filterpapier abgetupft und sofort zur Detektion der Signale für fünfzehn Sekunden bis fünfzehn Minuten ein Film aufgelegt.

2.2.17 Immunisierung von Kaninchen und Präparation der Antiseren

200 µg eines in Bakterien exprimierten und gereinigten Proteins wurden mit PBS zu einem Volumen von 500 µl verdünnt. Für die Erstimmunisierung wurde das gleiche Volumen MPL+TDM+CWS Adjuvant System (Sigma) zupipettiert, für alle weiteren Immunisierungen inkomplettes Freundsches Adjuvans. Um die Mischung zu homogenisieren, wurden die Proben bis zu drei Minuten beschallt. Das Protein wurden den beiden Kaninchen subcutan fünfmal im Abstand von drei bis vier Wochen injiziert.

Aus einer Ohrvene wurde Blut vor der ersten Immunisierung zur Gewinnung von Normalse- rum (Präimmunserum), sowie zwei Wochen nach dem jeweiligen boost (ab dem 2. „boost“, d. h. der insgesamt 3. Immunisierung) entnommen. Das Blut wurde 1-2 h bei 37°C und anschließend 17 h bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die festen Bestandteile bei RT mit 2.500 UpM für 3 min in der Minifuge abzentrifugiert. Danach wurde das Serum aliquo- tiert und bei -70°C gelagert.

2.2.18 Software

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

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse mit RHDV

3.1.1 RHDV-Expressionsklon pR1228

Um eine möglichst authentische und starke Expression von RHDV-Proteinen im heterologen System mit Vaccinia-T7 in BHK-Zellen zu erzielen, wurde ein cDNA-Klon von RHDV hinter einer IRES kloniert (Meyers et al., 2000). Dadurch erreicht man eine bessere Translation der mit der T7-RNA-Polymerase erzeugten RNA und kann auf stärkere Signale und einfachere bzw. eindeutige Auswertungen hoffen. Da bei diesem System direkt nach der IRES das Startkodon folgt, fehlt diesem Klon die 5'-nicht-translatierende Region (5'-NTR), die bei RHDV allerdings lediglich 9 Nukleotide umfasst. Der Anfang des ORF1-Polypeptids bleibt jedoch unverändert gegenüber der natürlichen RHDV-Sequenz. Der Aufbau erfolgte im pCITE2a-Plasmid, das die IRES des Encephalomyocarditis Virus (EMCV) enthält, aus vorhandenen Subklonen und einem PCR-Zwischenschritt. Die folgende Abbildung 3 faßt dies zusammen:

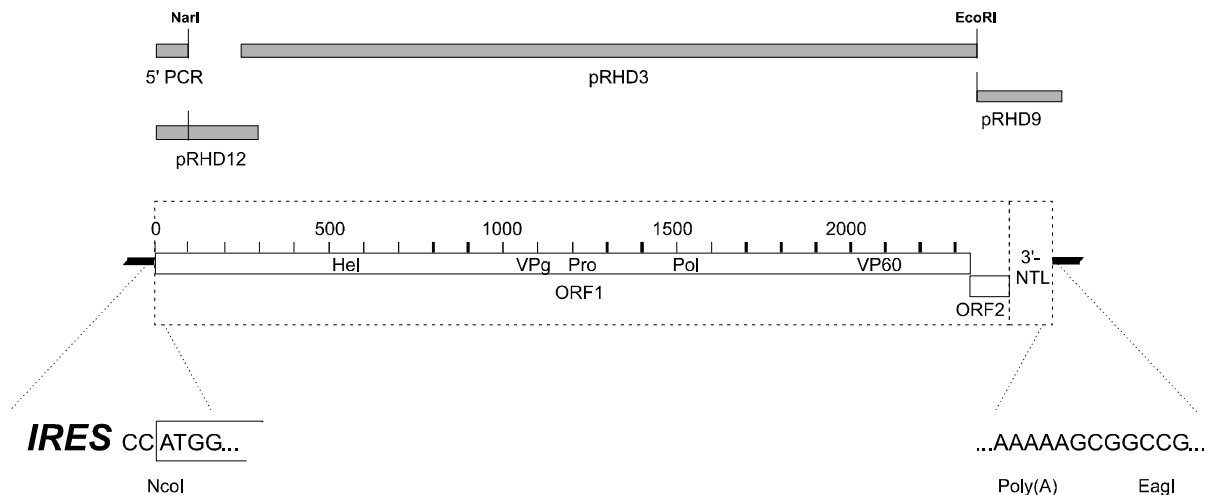


Abb. 3: Schema des Expressionskonstruktes pR1228. Oben sind die vorhandenen Subklone (Meyers 1991b) und das PCR-Produkt dargestellt. In der Mitte der RHDV-kodierende Bereich mit einer Skala für Aminosäuren. Unten sind die 5'- bzw. 3'-Übergänge von der RHDV-Nukleotidsequenz zum Vektor dargestellt.

3.1.2 Detektion der RHDV-Proteine nach transienter Expression

Die Proteinexpression durch pR1228 wurde nach Transfektion des Plasmids in BHK-Zellen und metabolischer Markierung mit ^{35}S markierten Aminosäuren untersucht. Die transiente Expression erfolgte mit dem Vaccinia Virus-T7-System (Wyatt et al., 1995). Die gebildeten Proteine wurden durch RHDV-spezifische Antiseren nachgewiesen (Wirblich 1995). Dies geschah durch Radioimmunpräzipitationen und anschließende denaturierende PAGE.

Der ORF1 kodiert theoretisch für ein Polyprotein mit 2.344 Aminosäuren. Dieses war aber nicht nachweisbar, sondern es wurden je nach verwendetem Antiserum eines oder mehrere kleinere Produkte nachgewiesen – ein eindeutiger Hinweis auf die Prozessierung des Polyproteins. Die Abbildung 4 faßt die entsprechenden Daten zusammen und zeigt auch die Regionen des RHDV-Genoms, mit deren Translationsprodukten die Antiseren spezifisch reagieren. Zusätzlich zu großen Banden, die durch unvollständige Prozessierung entstehen, traten im N-terminalen Bereich des RHDV-Klons mit den Antiseren B - E Banden mit 16, 23, 37 und 60 kDa auf (Abb. 4 A). Dieses Ergebnis ist konsistent mit der vorgeschlagenen Polyproteinorganisation in diesem Bereich (König et al., 1998; Wirblich et al., 1996), die die Abfolge $\text{NH}_2\text{-p16-p23-p37}$ vorschlagen. Entsprechend repräsentiert p60 den Vorläufer von p23 und p37. Das p16 erscheint dabei nur sehr schwach. Dies ist nicht ein Problem der Markierung (es sind mehrere Methionine/Cysteine vorhanden), sondern wohl von der Stabilität des Proteins abhängig (s. u.). Das Ergebnis deckt sich auch in diesem Punkt mit den Daten in der Literatur. Die Abbildung 4 B zeigt das Ergebnis des entsprechenden Ansatzes für den mittleren Teil des Polyproteins, der den p41-Vorläufer umfasst, nach Präzipitation mit den Antiseren F – I. Dabei kann das p41 mit allen 4 Antiseren gefällt werden. Außerdem erkennt man spezifische Banden mit 29 (p29), 23 (p23/2), 18 (p18) und 13 (p13) kDa. Da p29 von allen Antiseren außer I erkannt wird, muss es sich um das N-terminale Polypeptid in diesem Bereich handeln. Den dazugehörigen C-Terminus von p41 bildet das p13, das von allen Antiseren außer G erkannt wird. Aus dem Vergleich mit den publizierten Daten (s.o.) ergibt sich, dass es sich bei p13 um das VPg handelt. Durch die Zuordnung der Antiseren, zu den entsprechenden Bereichen des Polyproteins und den jeweils gefällten Produkten, ergibt sich, dass p23/2 ein Teil von p29 darstellt und p18 im C-terminalen Bereich von p41 lokalisiert ist, da es nicht mit G reagiert. Die Proteine p13 und p18 sind koterminale, da sie beide mit dem Antiserum I stark reagieren, aber mit J kein Signal ergeben. Das Polyprotein p23/2 wurde bereits beschrieben (König et al., 1998), allerdings blieb unklar, wo der „Rest“ des p29 zu lokalisieren ist. Dieses bisher nicht detektierte Protein von etwa 5 kDa (p5) war aber auch mit dem in Abbildung 2

gezeigten Experiment nicht nachzuweisen. Es wurde aber zum erstenmal ein p18 identifiziert. Aufgrund der Lokalisation von p18 am Ende von p41 ergibt sich, dass das gesuchte p5 zwischen p23/2 und p13 liegen muß.

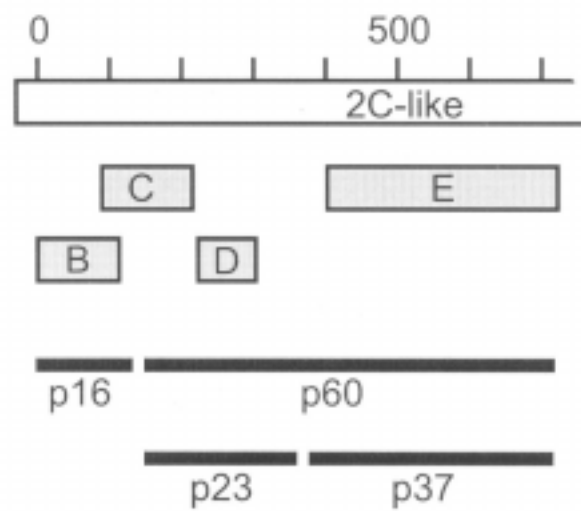
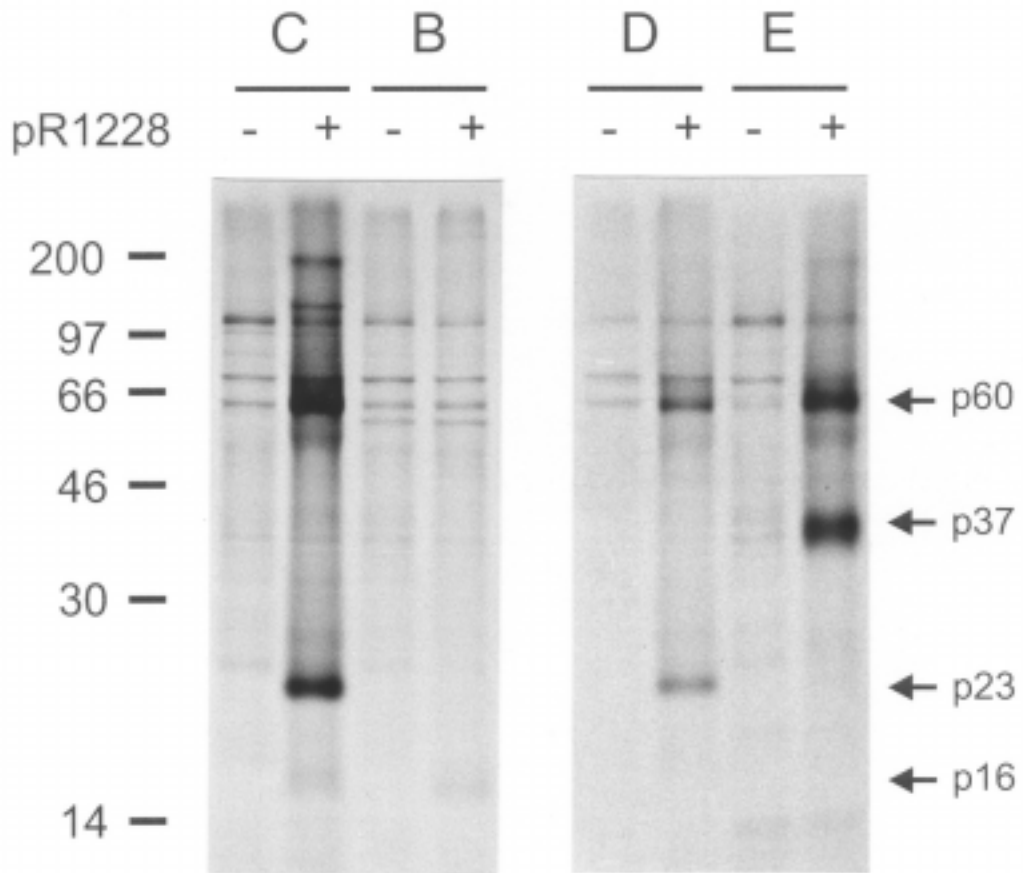
An die p41-Region schließt sich ein Polypeptid mit 72 kDa (p72) an, das die virale Protease (Pro, p15) und RNA-Polymerase (Pol, p58) enthält. Den Abschluss des ORF1 bildet das Hauptkapsidprotein VP60 mit 60 kDa. Die entsprechenden Polyproteinprozessierungsprodukte konnten auch nach transienter Expression von pR1228 mit den Antiseren J und M dargestellt werden. Das Translationsprodukt vom ORF2, das minore Kapsidprotein VP10, reagiert mit dem Antiserum N und konnte ebenfalls aus pR1228 erhalten werden. Die Ergebnisse für den 3' terminalen Bereich des Expressionsklons pR1228 zeigt die Abbildung 4 C.

Insgesamt zeigte die Analyse der Produkte, dass die Expression des Klons pR1228 in diesem transienten System authentische Expression und Prozessierung der RHDV-Proteine zur Folge hatte. Kleinere Unterschiede bzgl. der Proteingrößen im Vergleich zu den Hepatocyten-Experimenten (König et al., 1998) beruhten vermutlich auf dem Fehlen von posttranslationalen Modifikationen, die in den BHK-Zellen nicht stattfanden. Auch scheinen die Mengenverhältnisse z.T. etwas anders zu sein. Voll bestätigt wurde jedoch das prinzipielle Prozessierungsschema für das RHDV-Polyprotein. Damit ist gezeigt, dass dieser Klon für weitere Untersuchungen zur Polyproteinprozessierung bei RHDV geeignet ist.

Folgende Seite:

Abb. 4: Etablierung des Expressionskonstruktes pR1228 für RHDV-Proteine. Immunpräzipitationen von Proteinen aus Zellen, die mit Vaccinia-MVA infiziert wurden, das die T7-RNA-Polymerase exprimiert. Die verwendeten Antiseren wurden über bakterielle Fusionsproteine, die definierte Abschnitte des Polyproteins von RHDV enthielten, gewonnen (Wirblich 1995). Der obere Teil zeigt die über SDS-PAGE aufgetrennten Proteine. Für jedes Antiserum (Großbuchstaben in der Kopfzeile) werden 2 Spuren gezeigt: Vorne die Präzipitation aus den Vaccinia-infizierten Kontrollzellen (-) und dahinter die Auftrennung nach Transfektion von pR1228 (+). Links von den Gelen ist jeweils ein Größenstandard gezeigt und rechts sind die im Text angesprochenen Banden markiert. Ein Schema unter den Gelen zeigt die Regionen, gegen die die einzelnen Antiseren reagieren. Das ORF1-Polypeptid wird durch einen weißen Balken dargestellt, der zur „Orientierung“ alle 100 AS Markierungen trägt. Im Balken sind die identifizierten „Funktionen“ (2C-like, VPg, Pro, Pol und VP60) angegeben. Das ORF2-Protein erscheint als separater Balken. Graue Balken kennzeichnen die Proteinabschnitte über deren Expression die Antiseren erhalten wurden (jeweils mit dem zugehörigen Buchstaben). Der untere Abschnitt mit den schwarzen Balken repräsentiert die angenommene Zuordnung der präzipitierten Banden zu bestimmten Regionen des Polyproteins. 4 A: Präzipitierte Proteine, die mit Antiseren aus dem N-terminalen Drittel des RHDV-Polyproteins gewonnen wurden.

4 A:



4 B:

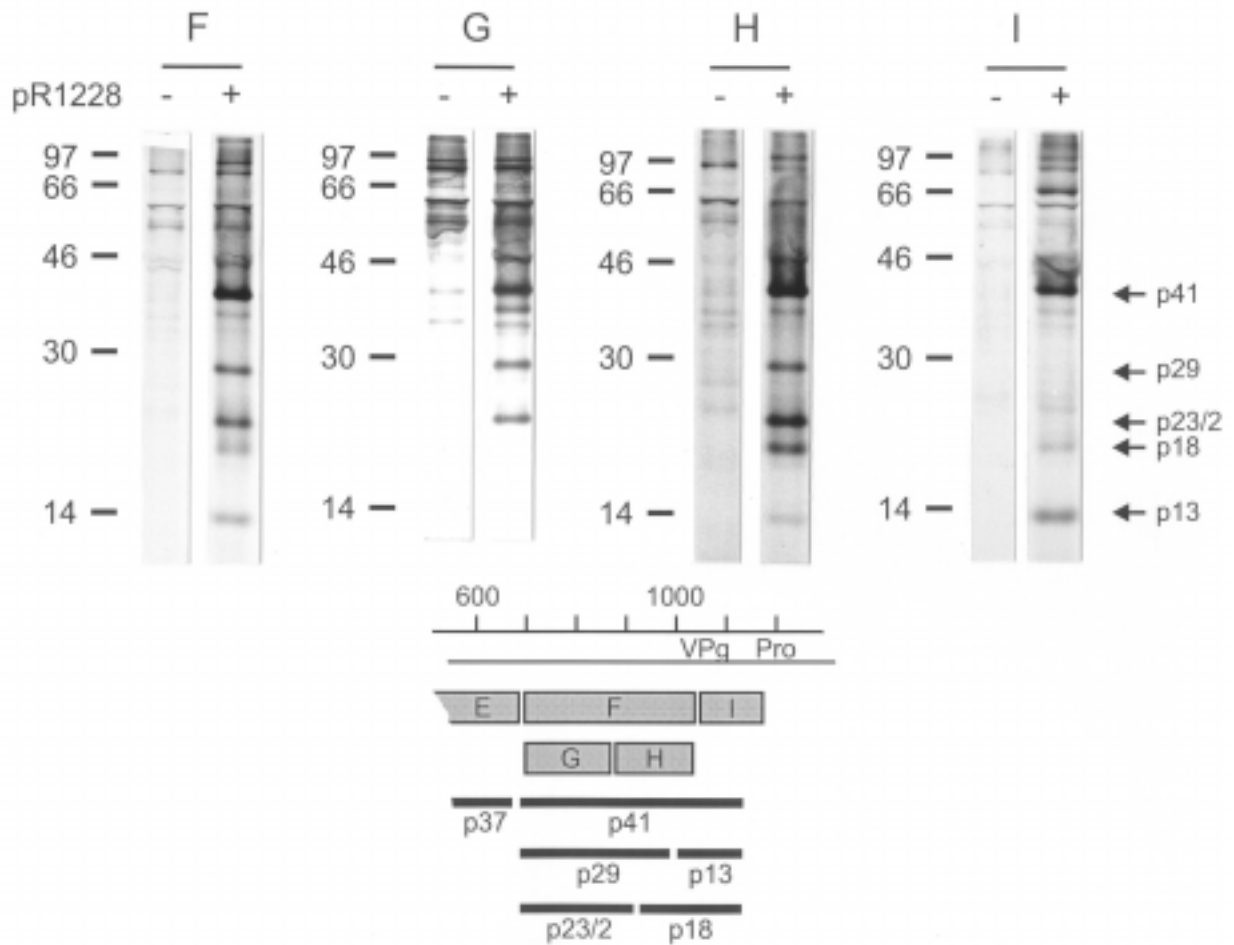


Abb. 4: Etablierung des Expressionskonstruktes pR1228 für RHDV-Proteine. Immunpräzipitationen von Proteinen aus Zellen, die mit Vaccinia-MVA infiziert wurden, das die T7-RNA-Polymerase exprimiert. Die verwendeten Antiseren wurden über bakterielle Fusionsproteine, die definierte Abschnitte des Polyproteins von RHDV enthielten, gewonnen (Wirblich 1995). Der obere Teil zeigt die über SDS-PAGE aufgetrennten Proteine. Für jedes Antiserum (Großbuchstaben in der Kopfzeile) werden 2 Spuren gezeigt: Vorne die Präzipitation aus den Vaccinia-infizierten Kontrollzellen (-) und dahinter die Auftrennung nach Transfektion von pR1228 (+). Links von den Gelen ist jeweils ein Größenstandard gezeigt und rechts sind die im Text angesprochenen Banden markiert. Ein Schema unter den Gelen zeigt die Regionen, gegen die die einzelnen Antiseren reagieren. Das ORF1-Polypeptid wird durch einen weißen Balken dargestellt, der zur „Orientierung“ alle 100 AS Markierungen trägt. Im Balken sind die identifizierten „Funktionen“ (2C-like, VPg, Pro, Pol und VP60) angegeben. Das ORF2-Protein erscheint als separater Balken. Graue Balken kennzeichnen die Proteinabschnitte über deren Expression die Antiseren erhalten wurden (jeweils mit dem zugehörigen Buchstaben). Der untere Abschnitt mit den schwarzen Balken repräsentiert die angenommene Zuordnung der präzipitierten Banden zu bestimmten Regionen des Polyproteins. 4 A: Präzipitierte Proteine, die mit Antiseren aus dem N-terminalen Drittel des RHDV-Polyproteins gewonnen wurden. 4 B: Das entsprechende Bild für die mittlere Region mit dem p41-Bereich.

4 C:

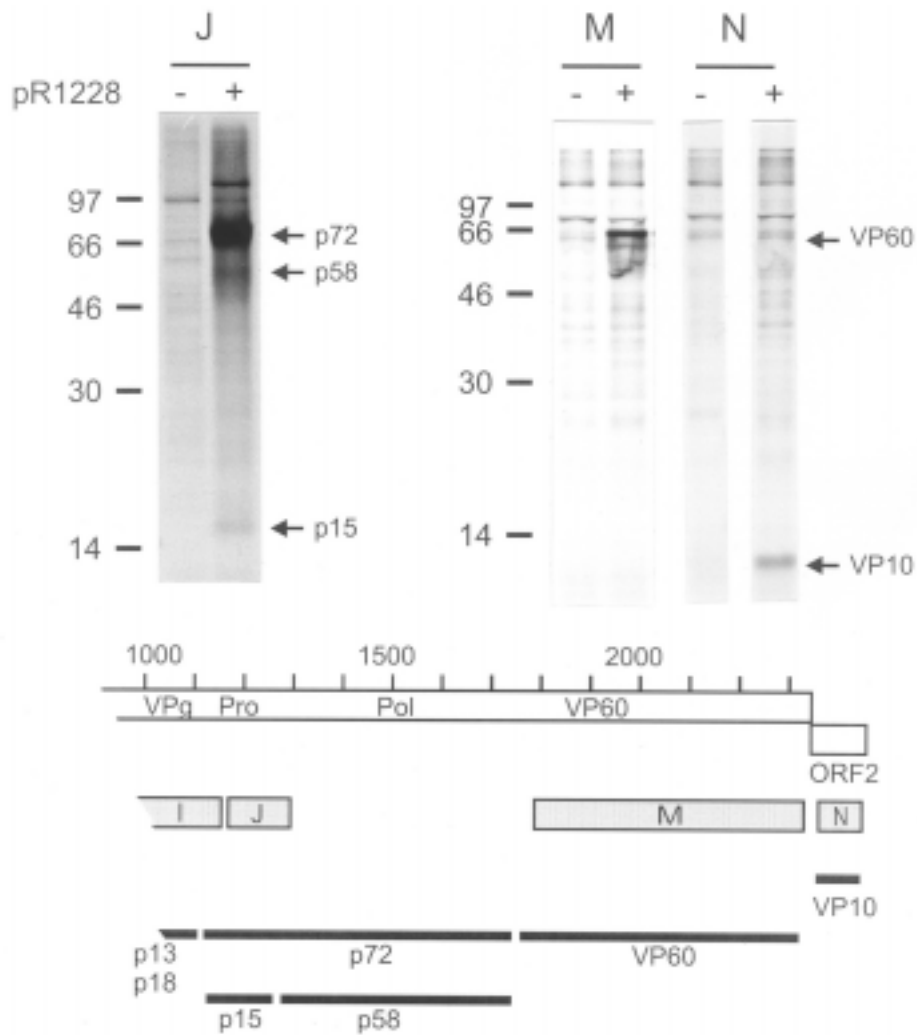


Abb. 4: Etablierung des Expressionskonstruktes pR1228 für RHDV-Proteine.

Immunpräzipitationen von Proteinen aus Zellen, die mit Vaccinia-MVA infiziert wurden, das die T7-RNA-Polymerase exprimiert. Die verwendeten Antiseren wurden über bakterielle Fusionsproteine, die definierte Abschnitte des Polyproteins von RHDV enthielten, gewonnen (Wirblich 1995). Der obere Teil zeigt die über SDS-PAGE aufgetrennten Proteine. Für jedes Antiserum (Großbuchstaben in der Kopfzeile) werden 2 Spuren gezeigt: Vorne die Präzipitation aus den Vaccinia-infizierten Kontrollzellen (-) und dahinter die Auftrennung nach Transfektion von pR1228 (+). Links von den Gelen ist jeweils ein Größenstandard gezeigt und rechts sind die im Text angesprochenen Banden markiert. Ein Schema unter den Gelen zeigt die Regionen, gegen die die einzelnen Antiseren reagieren. Das ORF1-Polypeptid wird durch einen weißen Balken dargestellt, der zur „Orientierung“ alle 100 AS Markierungen trägt. Im Balken sind die identifizierten „Funktionen“ (2C-like, VPg, Pro, Pol und VP60) angegeben. Das ORF2-Protein erscheint als separater Balken. Graue Balken kennzeichnen die Proteinabschnitte über deren Expression die Antiseren erhalten wurden (jeweils mit dem zugehörigen Buchstaben). Der untere Abschnitt mit den schwarzen Balken repräsentiert die angenommene Zuordnung der präzipitierten Banden zu bestimmten Regionen des Polyproteins. 4 C: Präzipitation von Produkten aus dem C-terminalen Bereich des ORF1 und dem ORF2, nachfolgend.

3.1.3 Einführung und Analyse von Spaltstellen-Mutanten

Bis dato waren vier Prozessierungsspaltstellen im ORF1-Polyprotein identifiziert worden (Alonso et al., 1996, Wirblich et al., 1995). Es ist aber nach den obigen Ausführungen zu erwarten, dass dieses Polyprotein 8-mal geschnitten wird. Nach bisherigen Daten sprach alles dafür, dass alle Spaltungen durch die bekannte virale Protease erfolgten. Dabei wird bei drei der vier bekannten Spaltstellen zwischen E(P1) und G(P1') prozessiert (vgl. Abb. 1). Eine Ausnahme bildet die Pro-Pol-Verbindung, bei der zwischen E und T gespalten wird, allerdings mit geringerer Effizienz als an den übrigen drei bekannten Positionen. Ausgedehnte Untersuchungen zu den Sequenzanforderungen der RHDV-Protease ergaben, dass das Dipeptid EG optimal ist, aber dass die Glutaminsäure durch Asparaginsäure oder Glutamin ersetzt werden kann und dass statt Glycin auch Alanin oder Serin an P1' toleriert werden (Wirblich 1995). Mit dem Wissen um die Anforderungen der viralen Protease und die Größe der erwarteten Proteine wurde die Sequenz des Polyproteins analysiert und auf entsprechende Dipeptide, bei deren Spaltung die beobachteten Produkte entstehen könnten, durchsucht. An solchen Positionen wurden Aminosäureaustausche eingeführt, die die Spaltung verhindern sollten (Wirblich 1995). Zusätzlich wurden auch bereits bekannte Spaltstellen mutiert, um das Prinzip und die Methode zu validieren. Insgesamt wurden 4 bekannte und 8 mögliche Protease-Spaltstellen verändert (Wirblich 1995).

Position	wt-Sequenz	Mutante	mut. Sequenz	Proteine
143 / 144	EG	143	GG	-
339 / 340	EG	339	PG	-
364 / 365	DT	364	GT	-
367 / 368	ED	367	GD	-
718 / 719	EG	718	GG	p37 / p41
776 / 777	EG	776	GG	-
823 / 824	EG	823	GG	-
940 / 941	QG	940	PG	-
993 / 994	QG	993	PG	-
1.108 / 1.109	EG	1.108	GG	VPg / Pro
1.251 / 1.252	ET	1.251	GT	Pro / Pol
1.767 / 1.768	EG	1.767	GG	Pol / VP60

Tab. 1: Zusammenfassung der Spaltstellen-Mutanten im ORF1

Position: AS-Position in der wt-RHDV-Sequenz; wt-Sequenz: Dipeptid, das die (mögliche) Spaltstelle flankiert; Mutante: Position, die verändert wurde; mut. Sequenz: Das aus der Mutation resultierende Dipeptid an der (möglichen) Spaltstelle; Proteine: Proteine, die durch die Spaltstelle getrennt werden (soweit bekannt, analog Wirblich 1995).

Die bereits vorliegenden mutierten Sequenzen wurden in den Klon pR1228 eingesetzt, so dass sich eine Serie von 12 Expressionskonstrukten ergab (Tab. 1). Analog zu den oben beschriebenen Experimenten mit pR1228 wurden die weiteren Analysen durchgeführt. Nach transienter Expression der Konstrukte in BHK-Zellen und radioaktiver Markierung der Produkte erfolgte die Radioimmunpräzipitation. Zur Analyse wurde PAGE und Autoradiografie durchgeführt. Dabei ergab sich, dass die Mutationen 339, 364, 776, 823 und 940 keine Veränderung gegenüber dem bekannten Proteinmuster bewirkten; diese Daten werden deshalb nicht als Bild gezeigt. Die übrigen Veränderungen der (möglichen) Spaltstellen hatten dagegen Einfluss auf das beobachtete Proteinmuster (Abb. 5-7).

Der Austausch an Position 143 bewirkte, dass weder p16 noch p23 zu beobachten waren; statt dessen trat eine neue Bande mit ca. 75 kDa (fp75) auf. Daraus ergibt sich, dass die Spaltung zwischen p16 und p23 höchstwahrscheinlich zwischen den Aminosäuren 143 und 144 erfolgt. Das neu aufgetretene Produkt fp75 ist aber zu groß, um nur aus p16 und p23 zu bestehen. Da dieses Protein auch mit dem Serum gegen das p37 gefällt wurde, liegt es nahe, dass fp75 aus den 3 Proteinen p16, p23 und p37 zusammengesetzt ist. Da fp75 relativ prominent auftrat, war die Spaltung zwischen p23 und p37 durch die Mutation 143 offensichtlich beeinflusst, aber nicht verhindert, denn zusätzlich zu fp75 konnte auch p37 detektiert werden. In jedem Fall bleibt festzuhalten, dass die Spalteffizienz an einer anderen als der mutierten Position deutlich vermindert war. Im Gegensatz dazu hat die Mutation E367G, die die Bildung von p23 und p37 verhindert, keinen Einfluss auf andere Prozessierungsschritte. Dies ist daran abzulesen, dass nur das p16 und das p60 zu beobachten waren, während p23, p37 und fp75 nicht auftraten. Da gleichzeitig die Veränderungen an den Positionen 339 und 364 keinen Einfluss auf das beobachtete Bandenmuster hatten, legen diese Ergebnisse nahe, dass das Dipeptid EG an der Position 367/368 die Spaltstelle zur Generierung von p23 und p37 aus dem Vorläufer p60 darstellt (Abb. 5 A).

Abb. 5 A:

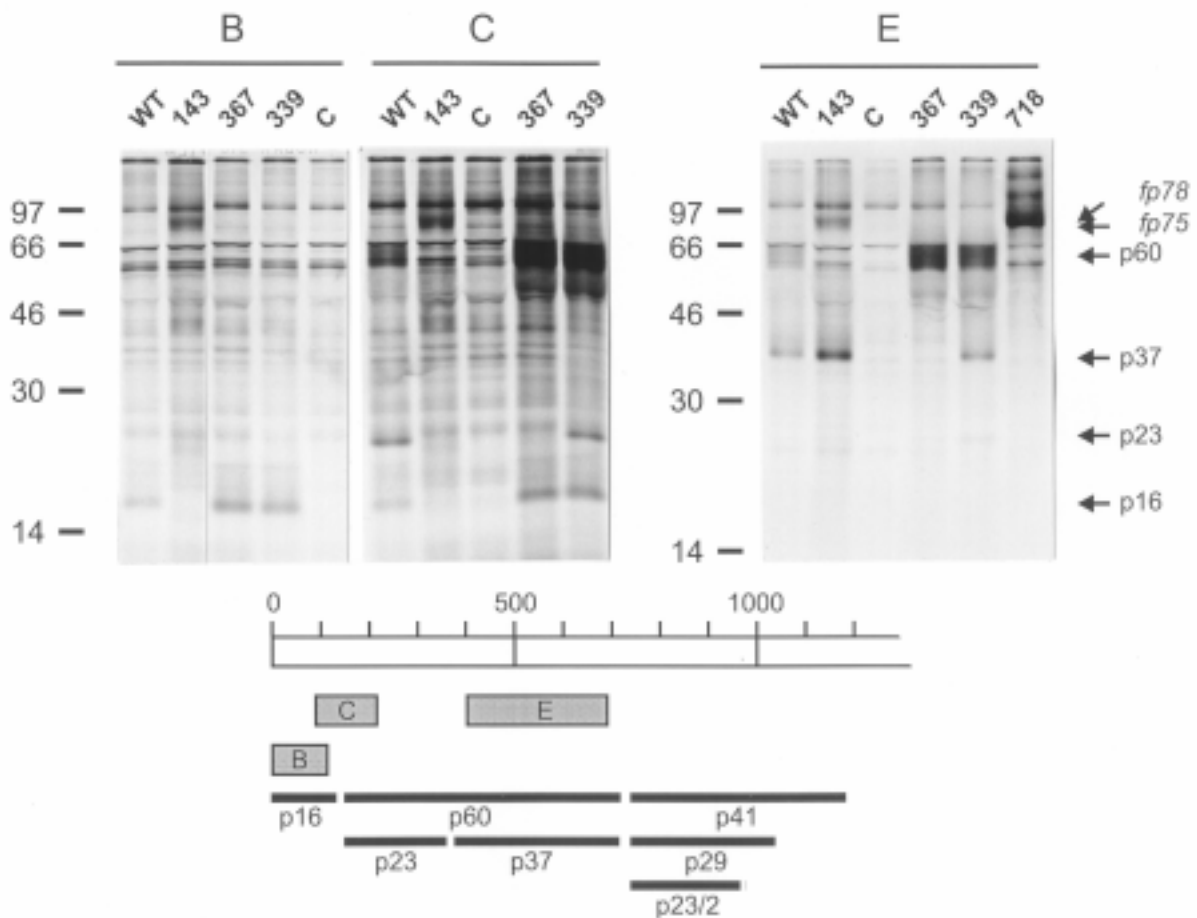


Abb. 5 A: Analyse der Expressionsprodukte von pR1228 (wt) und den entsprechenden Mutanten im vorderen Drittel des ORF1 (vgl. Tab. 1). Die Nummern über den Spuren kennzeichnen die Position der Mutation; zum Aufbau der Abbildung vgl. auch Legende zu Abb. 4. Als Folge der Mutationen neu auftretende Banden wurden mit „fp“ (Fusionsprotein) und Größe in kDa bezeichnet. Die Position des mutierten Kodons steht direkt über der entsprechenden Spur. Die relevanten Banden wurden mit Pfeilen markiert und bezeichnet. C: Vaccinia Virus-Kontrolle.

Aufgrund der Unklarheiten, die bzgl. der Prozessierung im p41-Bereich bestanden (vgl. Abb. 1), waren die Versuche für diesen Bereich besonders interessant. Die Spaltstelle EG an den Positionen 718/719 war bereits für die Trennung zwischen p37 und p41 bekannt (Alonso et al., 1996). Die Mutation E718G im Expressionskonstrukt pR1228 bewirkte, dass mit dem Antiserum E ein Fusionsprotein von ca. 78 kDa (fp78) detektiert werden konnte. Dieses fp78 besteht aus p37 und p41, da gleichzeitig diese beiden Proteine nicht mehr detektierbar waren. Überraschenderweise hat die Blockierung der Spaltung nach Position 718 weitreichende Folgen auf die Prozessierung dieses zentralen Abschnitts des ORF1-Polypeptids. Zusätzlich zum erwarteten Fehlen der Proteine p41, p29 und p23/2 konnten auch die Produkte p18 und p13 nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 5 B). Damit verhindert eine Blockierung der Spaltung

am Aminoterminus von p41 offensichtlich sämtliche weitere Prozessierungsschritte, die sonst innerhalb dieses Polypeptides erfolgen.

Abb. 5 B:

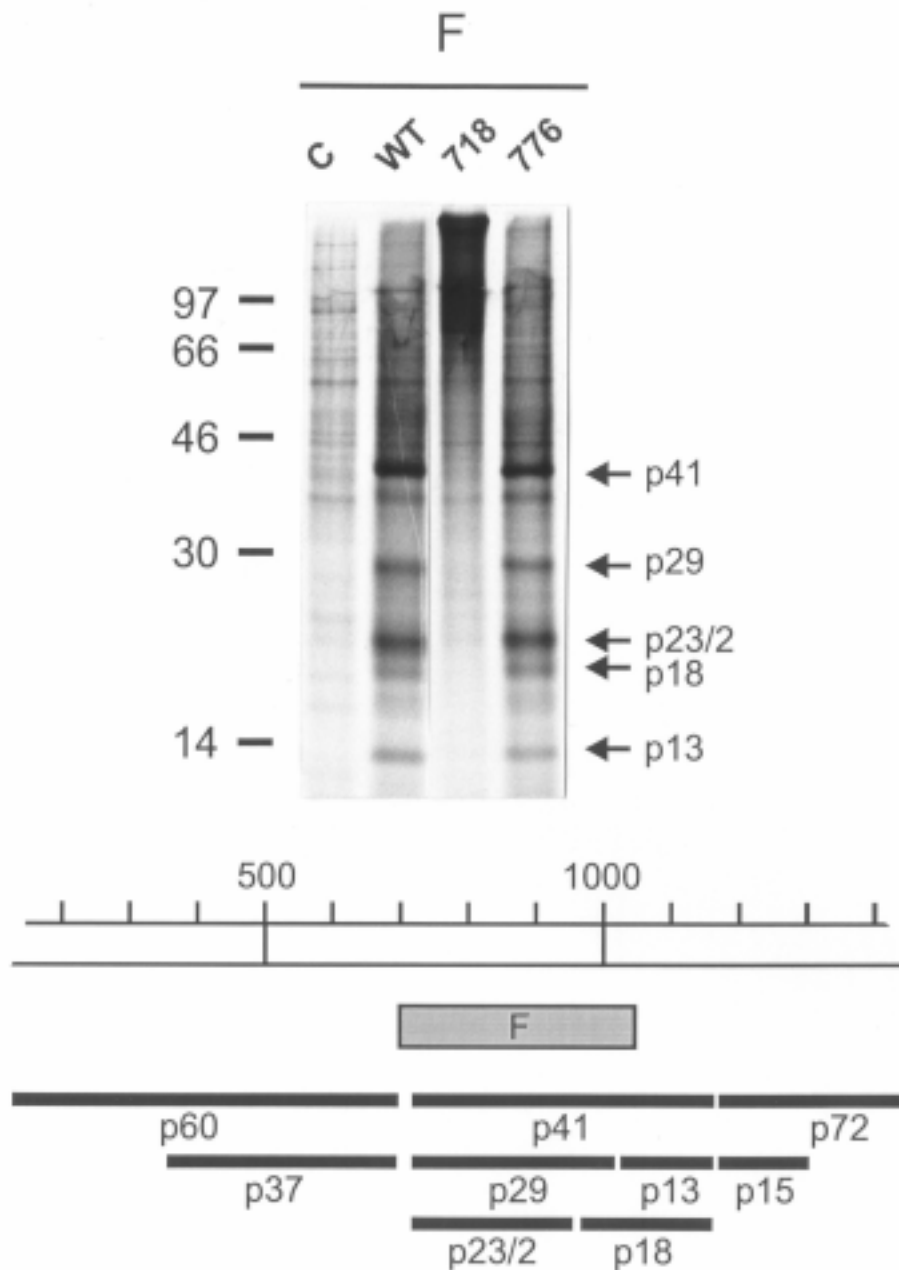


Abb. 5 B: Analyse der Expressionsprodukte von pR1228 (wt) und den entsprechenden Mutanten im zentralen Bereich des ORF1 (vgl. Tab. 1). Die Nummern über den Spuren kennzeichnen die Position der Mutation; zum Aufbau der Abbildung vgl. auch Legende zu Abb. 4. Die Position des mutierten Kodons steht direkt über der entsprechenden Spur. Die relevanten Banden wurden mit Pfeilen markiert und bezeichnet. C: Vaccinia Virus-Kontrolle.

Innerhalb des p41 kamen die Dipeptide EG (776/777), EG (823/824), QG (940/941) und QG (993/994) als Prozessierungsstellen in Frage. Gemäß Tabelle 1 wurden alle diese Positionen so

verändert, dass die Spaltung durch die virale Protease unterbunden sein sollte. Die Analyse der Expressionsprodukte zeigte für die Mutanten 776, 823 und 940 keine Veränderung gegenüber dem wt-Konstrukt. Mit der Mutante Q993G konnten dagegen Erkenntnisse gewonnen werden. Mit diesem Konstrukt waren die Banden für p13 und p29 nicht mehr nachzuweisen, aber p41, p23/2 und p18 traten immer noch auf. Daher blockiert diese Mutante die Spaltung am N-Terminus des VPg (p13) und Q993 ist wahrscheinlich die P1-Position dieser Spaltstelle. Die carboxyterminale Spaltstelle des p41, der Übergang VPg/Protease, war bereits durch Proteinsequenzierung aufgeklärt (Wirblich 1995, Alonso 1996). Es handelt sich um das Dipeptid EG (1.108/1.109). Die Mutation E1108G verhinderte die Bildung von p41, p13 (VPg), p72 (Pro/Pol) und p15 (Pro). Auch p18 war nicht mehr nachzuweisen. Stattdessen trat ein ungewöhnliches Produkt mit ca. 56 kDa Größe (fp56) auf. Da dieses Protein mit den Antiseren F, I und J reagierte, stellt es wahrscheinlich das Fusionsprotein aus p41 und der Protease dar. Auch eine Bande von etwa 115 kDa trat mit größerer Intensität im Vergleich zum Wildtyp auf. Dieses Protein (fp115) stellt wohl ein Prozessierungsprodukt dar, in dem die Proteine p41 und p72 enthalten sind. Mit den Antiseren I und J trat ebenfalls neu eine Bande mit ca. 29 kDa auf (fp29), die aus den Proteinen VPg und Pro bestehen sollte. Aufgrund der Größe wandert diese Bande im Gel mit dem p29 zusammen und kann daher mit dem Antiserum F nicht separat detektiert werden. Allerdings deutet das verstärkte Signal bei 29 kDa darauf hin, dass sich in dieser Bande zwei Proteine darstellen. Mit den Antiseren I und J ließ sich für die Mutante 1108 eine Bande von ca. 26 kDa darstellen. Da dieses Produkt mit Antiserum F nicht detektiert werden konnte, handelt es sich wahrscheinlich um eine aberrante Spaltung im VPg. Das Protein p23/2 blieb mit dieser Mutante unverändert sichtbar. Zu erwarten waren auch Fusionsproteine für p18 bzw. p72. Tatsächlich waren auch weitere spezifische Banden zu detektieren, aber jeweils mit nur geringer Intensität. Zusammenfassend kann man sagen, dass Mutationen am Carboxyterminus von p41 oder am Aminoterminus von VPg erheblich geringeren Einfluss auf die Prozessierung anderer Teile des Polyproteins haben als die Blockierung der Spaltung am Aminoterminus von p41. Diese Daten sprechen auch für die angenommene Anordnung der Proteine innerhalb des p41, bei der p23/2 den aminoterminalen Teil darstellt und p18 der carboxyterminalen Region entspricht. Allerdings ist festzuhalten, dass mit den durchgeführten Experimenten die Schnittstelle zwischen p23/2 und p18 nicht identifiziert werden konnte (Abb. 6).

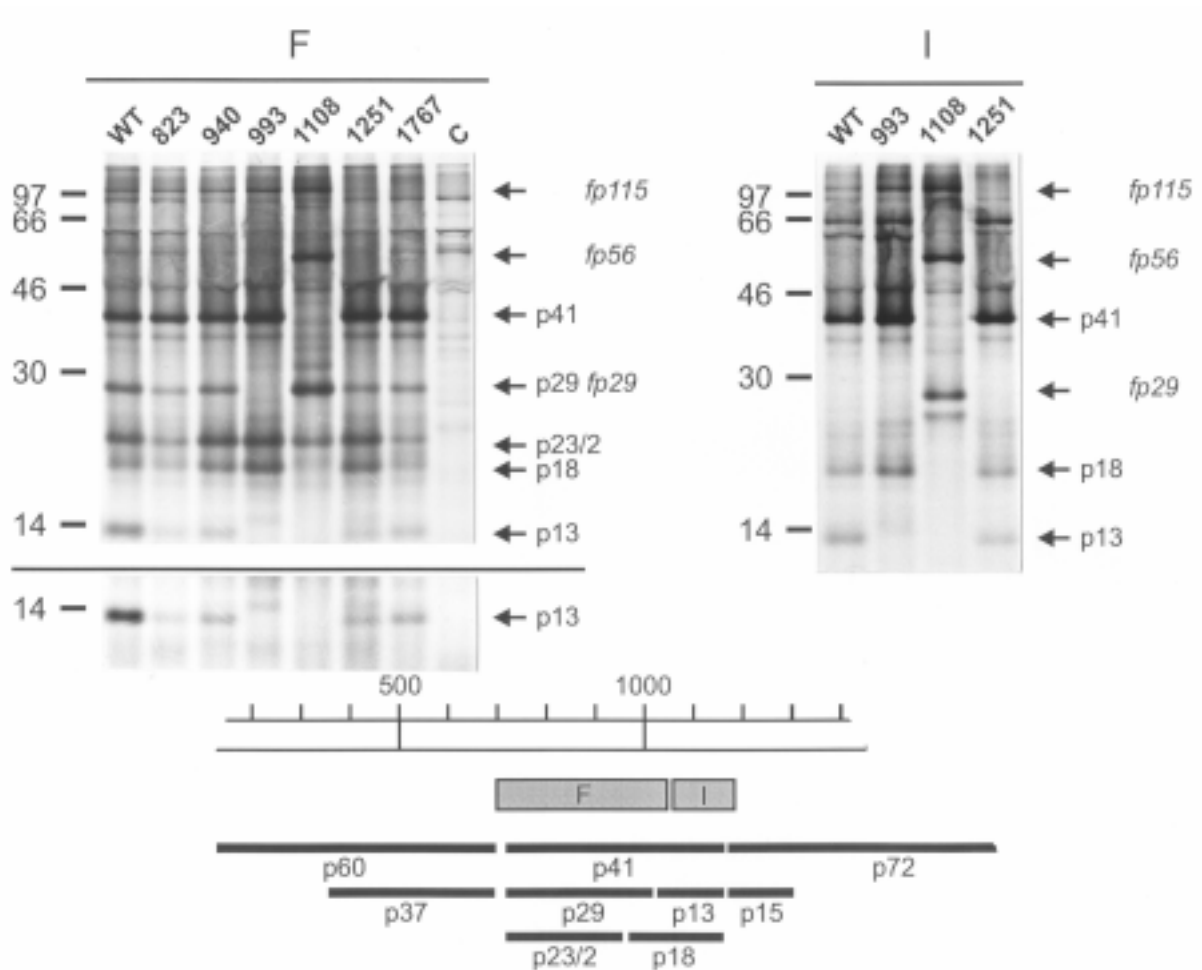


Abb. 6: Analyse der Expressionsprodukte von pR1228 (wt) und den entsprechenden Mutanten im zentralen Bereich des ORF1 von RHDV (vgl. Tab. 1). Die verwendeten Antiseren stehen ganz oben, die Position der Mutationen über der entsprechenden Spur. Abgesetzt ist eine längere Exposition gezeigt. Für weitere Erläuterungen vgl. Legenden zu Abb. 4 und 5.

Auch die C-terminale Spaltstelle der Protease und die Schnittstelle zwischen der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRp) und dem Hauptkapsidprotein VP60 waren bereits identifiziert worden (Wirblich 1995, Alonso et al., 1996). Die Mutationen an Position 1251 bzw. 1767 bewirkten die erwarteten Blockierungen der entsprechenden Spaltungen. Nach Präzipitation mit dem Antiserum I konnte bei 1108 eine weitere Komigration von Prozessierungsprodukten beobachtet werden. Das neu auftretende fp56 war von der bekannten p58-Bande nicht zu unterscheiden. Wie zu erwarten, war p72 nicht mehr nachzuweisen. Die Blockierung der Spaltung am C-Terminus der Protease führte zum erwarteten Verlust der Banden p15 und p58. Etwas überraschend war allerdings, dass weder die Blockierung der Prozessierung am N- noch am C-Terminus der Protease einen weitergehenden Einfluss auf die Prozessierung des restlichen Polyproteins im verwendeten Analysensystem hatte.

Auch die Mutante 1767 zeigte genau den erwarteten Effekt mit der Blockierung der Prozessierung des C-terminalen Abschnitts des Polyproteins. Die Banden für p72 oder p58 waren

nach Präzipitation mit Antiserum K nicht mehr nachweisbar, und auch das VP60 war mit M nicht mehr detektierbar. Dafür waren jeweils entsprechend größere Fusionsproteine (fp120, fp135) zu erkennen. Diese entsprechen wohl VP60 mit p58 (fp120) und VP60 mit p72 (fp135) (Abb. 7).

Abb. 7 A:

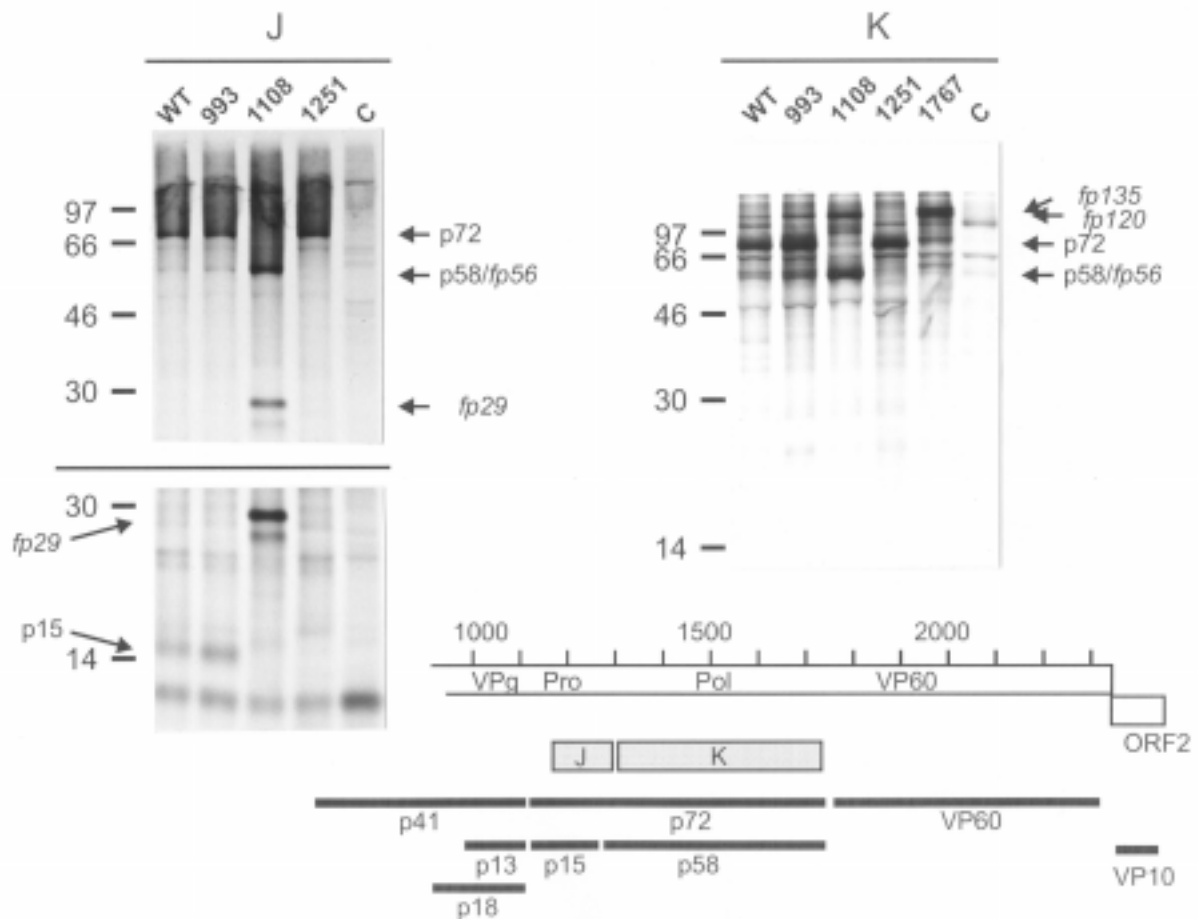


Abb. 7 A: Analyse der Expressionsprodukte von pR1228 (wt) und den entsprechenden Mutanten im hinteren Abschnitt des ORF1 von RHDV (vgl. Tab. 1). Die verwendeten Antiseren stehen ganz oben, die Position der Mutationen über der entsprechenden Spur. Abgesetzt ist eine längere Exposition gezeigt. Für weitere Erläuterungen vgl. Legenden zu Abb. 4 und 5.

Abb. 7 B:

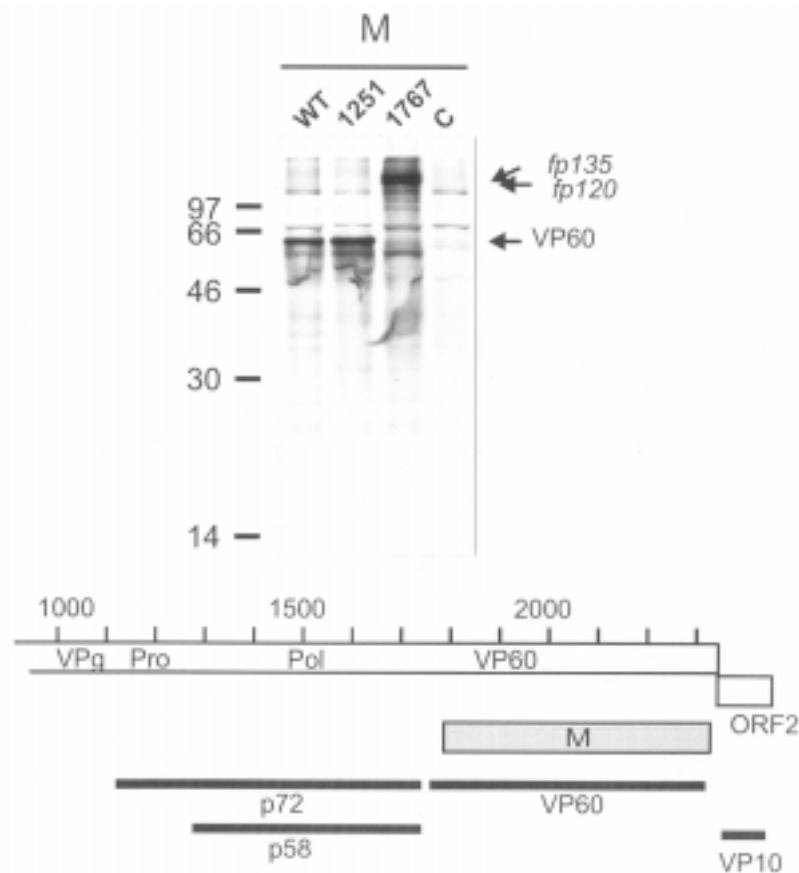


Abb. 7 B: Analyse der Expressionsprodukte von pR1228 (wt) und den entsprechenden Mutanten im hinteren Abschnitt des ORF1 von RHDV (vgl. Tab. 1). Die verwendeten Antiseren stehen ganz oben, die Position der Mutationen über der entsprechenden Spur. Für weitere Erläuterungen vgl. Legenden zu Abb. 4 und 5.

3.1.4 Kinetik der Polyproteinprozessierung

Zur Analyse der Kinetik der Polyproteinprozessierung wurden Experimente mit der transienten Expression des Klons pR1228 durchgeführt. Dabei wurde die Zeit, während der radioaktiv markiert wurde, zwischen 10 Minuten und 4 Stunden variiert. Die übrigen Zeiten (Infektion mit dem Vaccinia Virus und Transfektion der DNA) blieben gegenüber den bereits beschriebenen Versuchen unverändert. Auch die Detektion der Proteine durch Autoradiografie nach Radioimmunpräzipitation mit den bereits beschriebenen spezifischen Antiseren und SDS-PAGE wurde nicht verändert. Bereits nach 10 Minuten Markierung waren die Banden von p16, p23, p37, p60, p41, p58, p72 und VP60 zu erkennen. Durch Verlängerung der Markierungszeiten hat sich das Bild kaum verändert, wenn man davon absieht, dass die Intensität der Banden mit zunehmender Markierungsdauer höher wurde. Die einzige Ausnahme bildete das p16, dessen Bande bei 1 Stunde Markierung ein klares Maximum aufwies. Die Prozessie-

rungsprodukte des p41, die Proteine p13 (VPg), p18, p23/2 und p29 waren dagegen erst nach längerer Markierung nachzuweisen. Erstaunlicherweise konnten Vorläufer mit größerem Molekulargewicht nicht zweifelsfrei identifiziert werden. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Spaltungen an den Übergängen p16-p23/p60, p37/p60-p41, p41-p72 und p72-VP60 sehr rasch ablaufen. Auch die Verhältnisse zwischen den Vorläufern und den Spaltprodukten, hier zwischen p60 und p23/p37 bzw. p72 und p58, schienen sich in Abhängigkeit von der Markierungsdauer nicht zu verändern. Daraus kann man – zumindest für die transiente Expression – folgern, dass die Verhältnisse der Prozessierungsprodukte des RHDV-ORF1-Polyproteins sehr rasch ein Fließgleichgewicht erreichen. Die Abbildung 8 gibt die Ergebnisse wieder.

Abb. 8 A:

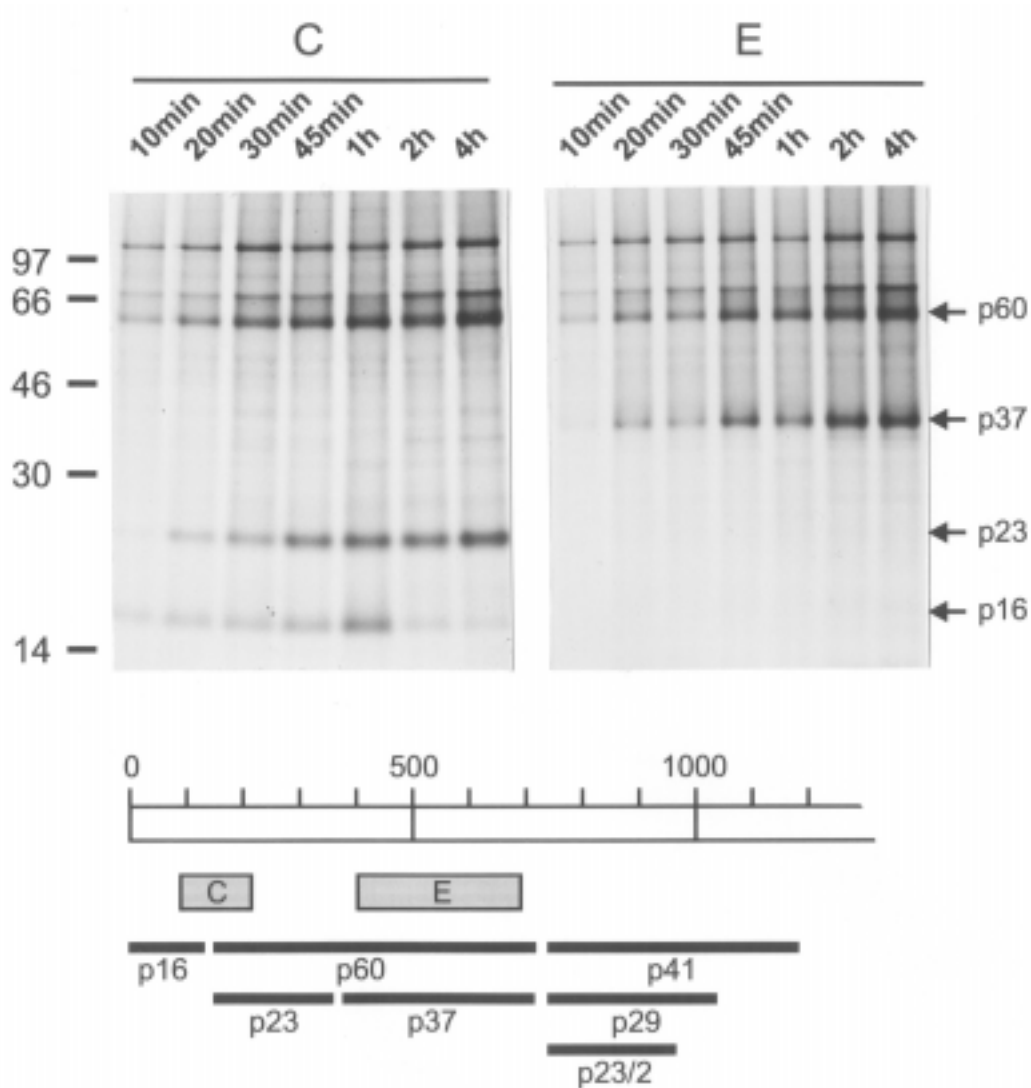


Abb. 8: Ausführliche Legende zu 8 A auf der folgenden Seite nach 8 C.

Abb. 8 B:

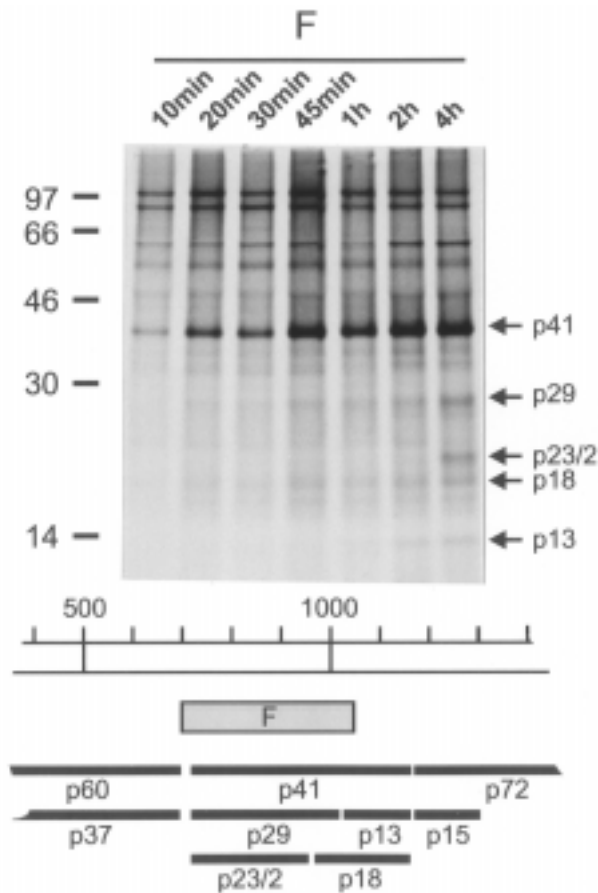


Abb. 8 C:

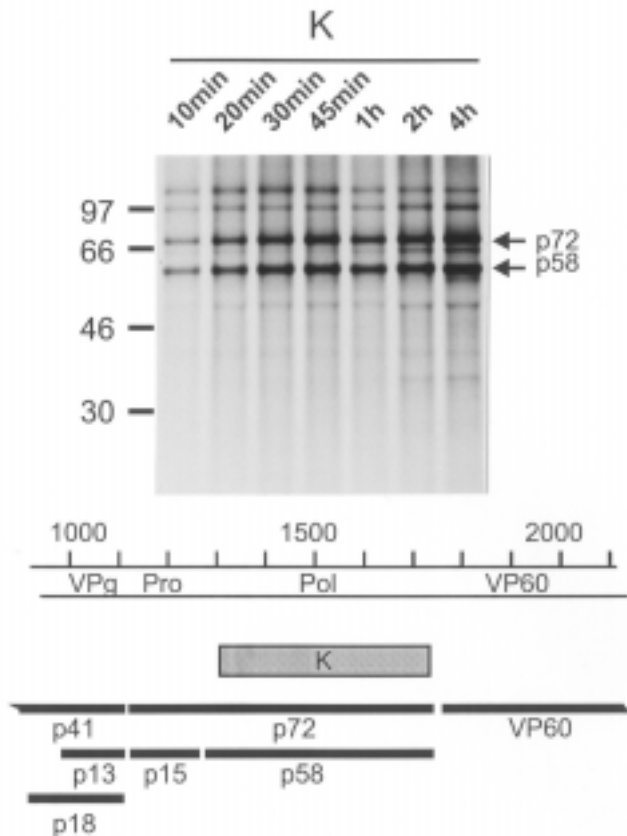


Abb. 8: Analyse der Expressionsprodukte von pR1228 nach verschiedenen langen Zeiten der radioaktiven Markierung. Die Teile stehen für A: Aminoterminales Drittel, B: Zentraler Bereich und C: Carboxyterminaler Abschnitt des ORF1-Polyproteins von RHDV. Vgl. auch die Legende zu Abb. 4. Oben stehen die verwendeten Antiseren, darunter über den Spuren die Markierungszeiten.

3.1.5 Polyklonales Serum gegen das postulierte „p5“

Aus den beschriebenen Versuchen wurde klar, dass zwischen VPg und p23/2 ein Protein von etwa 5 kDa Größe lokalisiert sein müsste. Dieses bis jetzt noch nicht nachgewiesene Protein wird im folgenden Text als p5 bezeichnet. Die Tatsache, dass p5 bislang noch nicht detektiert worden war, könnte darauf beruhen, dass die vorhandenen Antiseren keine oder nicht ausreichend affine Antikörper gegen dieses sehr kleine und hydrophobe Protein enthielten. Es wurde deshalb ein neues polyklonales Antiserum in Kaninchen erzeugt. Mittels PCR wurde mit den Oligonukleotiden RHD48 und RHD49 ein Fragment von 136 Nukleotiden amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen BamHI und PstI in pQE30 eingefügt. Die Oligonukleotide waren dabei so ausgewählt worden, dass das exprimierte Fragment ausschließlich aus der postulierten p5-Region bestehen sollte. Die Expression des Fragments mit N-terminalem His₆-„tag“ und Reinigung über Ni²⁺-NTA-Agarose erfolgte gemäß dem beschriebenen Protokoll

und zu guten Ausbeuten an Protein mit ausreichender Reinheit. Mit diesem Protein wurden 2 Kaninchen grundimmunisiert und danach im Abstand von 4 Wochen insgesamt 6 mal „geboostet“. Dabei wurde jeweils mit 0,13-0,17 mg Protein subcutan im Nackenbereich immunisiert. Ab dem zweiten „boost“ wurden die Seren getestet. Dazu wurden Radioimmunpräzipitationen durchgeführt. Dabei reagierten die Seren aus beiden Tieren ab dem 3. „boost“ mit dem p41. Damit war bewiesen, dass im p5-Bereich des Polyproteins zumindest ein antigenes Epitop lokalisiert ist und die Seren spezifisch mit diesem reagierten. Leider gelang es trotz längeren Expositionszeiten und Optimierungsversuchen bei der Radioimmunpräzipitation bzw. der Detektion, nicht das p5 als Protein und Prozessierungsprodukt des ORF1-Polyproteins in BHK-Zellen darzustellen. Die weiter oben beschriebenen Ergebnisse konnten auch mit diesem Antiserum bestätigt werden, aber für die Polyproteinprozessierung ergaben sich keine neuen Erkenntnisse.

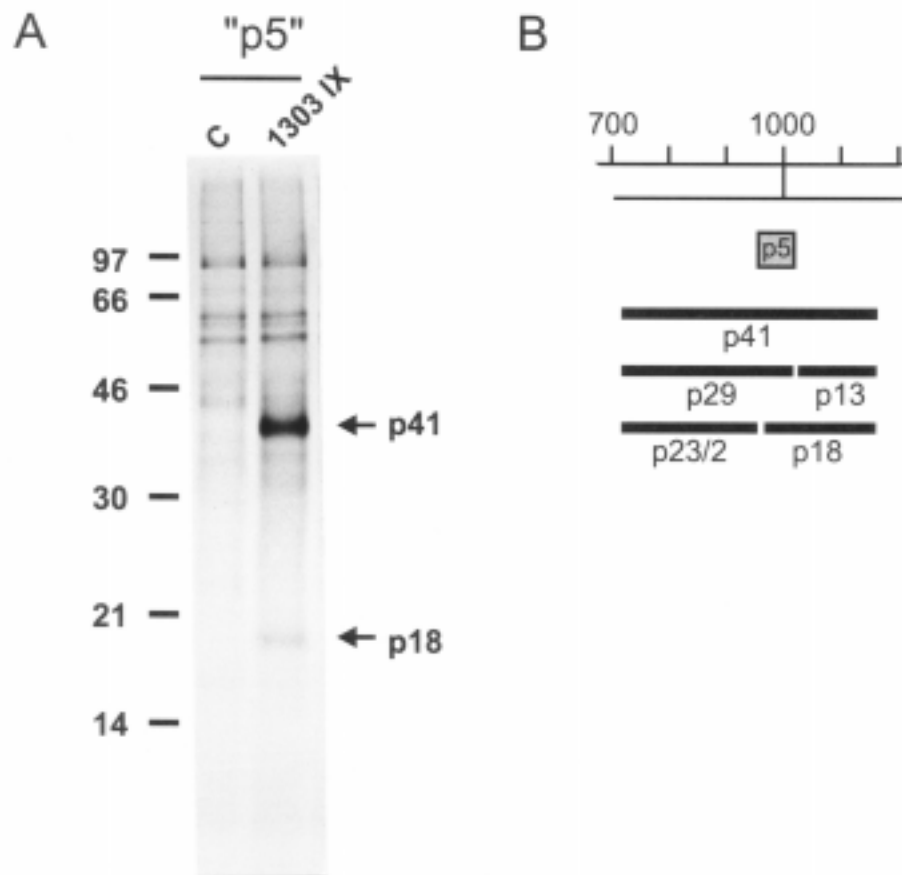


Abb. 9: A: Radioimmunpräzipitation der Expression des Klons 1303 IX mit dem Antiserum gegen p5. Der Klon 1303 IX dient als Beispiel, vgl auch 3.1.6. C: Vaccinia-Kontrolle ohne spezifische Signale. 1303 IX nach der beschriebenen Analyse in BHK-Zellen. Man erkennt spezifische Banden bei 41 und 18 kDa. B: Zuordnung des Serums p5 (grauer Balken) zum entsprechenden Abschnitt des ORF1-Polyproteins mit Aminosäure-Längenmaßstab (weißer Balken, darüber) und den Prozessierungsprodukten (schwarze Balken, darunter).

3.1.6 Die Spaltstelle am N-Terminus von p5/p18

Aus den vorgestellten Daten ergab sich, dass von den erwarteten Spaltstellen lediglich diejenige am N-Terminus von p5/p18 noch nicht identifiziert worden war. Trotz des Fehlschlags mit einer ersten Mutante in diesem Bereich (pR1228 Q940P, s. o.), wurde mit dieser Methode weiter versucht, die Spaltstelle zu charakterisieren. Zu diesem Zweck wurde der vorgestellte Klon pR1228 deutlich verkürzt. Dabei entstand das Konstrukt 1303 IX, das auf einem pCITE2a-Vektor basiert, hinter dessen IRES die RHDV-Sequenzen von nt 2.117 (SacI) bis nt 4.119 (XbaI) folgten. Der von diesem Fragment kodierte Bereich beginnt kurz vor der p41-Region und endet in der Polymerase. Diese Verkürzung erfolgte aus praktische Gründen und sollte keinen oder nur geringen Einfluss auf die Prozessierung durch die virale Protease haben. Aufgrund der geringen Größe des p5 und der mittlerweile erfolgten genauen Lokalisation, wurden in dem in Frage kommenden Bereich verschiedene Mutationen eingeführt (G. Meyers, unveröffentlicht) und in der beschriebenen Form über radioaktive Markierung, Radioimmunpräzipitation und PAGE analysiert. Da davon ausgegangen wurde, dass auch diese Spaltung durch die RHDV-Protease erfolgt, wurde auch bei diesen Mutationen Asparaginsäure, Asparagin und Glutamin bzw. die Reste, die auf diese Aminosäuren folgten, ausgetauscht. Es wurde zunächst eine Mutation erzeugt, bei der alle fraglichen Reste verändert waren (1321). Nach Expression dieser Mutante konnten p23 und p18 tatsächlich nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 10), so dass davon auszugehen war, dass die Spaltung zwischen diesen beiden Proteinen durch diese Mutationen (Tab. 2) blockiert war. In einem zweiten Schritt wurden dann Einzelmutationen eingeführt, um die gesuchte Spaltstelle eindeutig zu identifizieren. Alle Mutationen fasst die nachfolgende Tabelle 2 zusammen.

Bei den in Tabelle 2 gezeigten Sequenzen fällt auf, dass im fraglichen Bereich mehrere Di-peptide vorkommen, die den Anforderungen der viralen Protease entsprechen könnten (Wirblich et al., 1995). So war auch nicht auszuschließen, dass die Protease in dieser Region mehrere Spaltpmöglichkeiten vorfindet und bei Blockierung einer Spaltstelle auf eine benachbarte, suboptimale Spaltstelle ausweicht. Es zeigte sich jedoch, dass dies nicht eintrat. Bei der Analyse der Expressionsprodukte, die von diesen verkürzten Klonen abgeleitet waren, fiel auf, dass das p29, das längere, N-terminale Prozessierungsprodukt des p41, nicht mehr oder nur noch marginal nachweisbar war.

Klon	(veränderte) Aminosäuresequenz Basis: RHDV-ORF1 AS 930 - 950
1303 IX (wt)	V A S D N V D R G D Q G V D V F T D P N L
1321	V A S D P V H R G G P G V H V F T D P N L
1303 V	V A S D N V D R G D P G V D V F T D P N L
1332 a	V A S D P V H R G D Q G V D V F T D P N L
1332 b	V A S D P V H R G D P G V D V F T D P N L
1334 a	V A S D N V D R G D Q G V H V F T D P N L
1334 b	V A S D N V D R G D P G V H V F T D P N L
1334 c	V A S D N V D R G G P G V D V F T D P N L
1334 d	V A S D N V H R G D Q G V D V F T D P N L
1334 e	V A S D N V D R G G Q G V D V F T D P N L
1334 f	V A S D N V H R G D P G V D V F T D P N L
1334 g	V A S D N V G R G D Q G V D V F T D P N L
1334 h	V A S D N V D G G D Q G V D V F T D P N L
1334 j	V A S D N V D P G D Q G V D V F T D P N L

Tab. 2: Mutanten zur Analyse der N-terminalen Spaltstelle von p5.

Links steht die Bezeichnung der Klone. Alle Klone haben den identischen Aufbau mit einer Insertion von 2 kb der RHDV-cDNA-Sequenz im pCITE2a-Vektor. Unterschiede bestehen nur im in der Tabelle dargestellten Bereich, der die rechte Spalte umfasst und die abgeleitete RHDV-Aminosäuresequenz des RHDV-Wildtyps bzw. der Mutanten im Bereich nt 2.797-2.859 darstellt.

Dieses Fragment trat bei keinem der untersuchten Klone deutlich in Erscheinung, so dass die Prozessierung in diesem Punkt von dem beim pR1228 gefundenen Schema abweicht. Aber p23 und p18 waren deutlich nachweisbar, so dass der Klon für Analysen in Bezug auf diese beiden Proteine geeignet war. Als Hauptkriterium für die Spaltung am N-Terminus von p5/p18 wurde das Auftreten des p23/2 gewählt, da diese Bande beim Klon 1303 IX immer zweifelsfrei nachzuweisen war und dieses Fragment nicht mehr entstehen sollte, wenn die gesuchte Spaltung unterbunden ist.

Der Klon 1303 IX war die Positiv-Kontrolle, hier lag im verkürzten Klon die Sequenz des RHDV unverändert vor. Man erkennt (Abb. 10) als prominente Banden das p41, das immer als starke Bande nachweisbar war (vgl. oben) und zudem das p23/2, während das p18 mit für die Abbildung verwendeten Serum kaum nachweisbar war (sehr feine Bande), aber mit anderen Seren zweifelsfrei detektiert wurde. Die Spaltung fand also statt. Mit dem Klon 1321, der die Kombination aller Mutationen enthielt, konnte gezeigt werden, dass die Spaltung am N-Terminus von p5/p18 prinzipiell blockierbar war, denn p23/2 trat nicht mehr auf. Als interne Kontrolle konnte das p41 verwendet werden, dessen unverändert starkes Auftreten den

Nachweis lieferte, dass die übrigen Spaltungen wie im Wildtyp funktionierten. Der Klon 1303 V zeigt nochmals die Mutation, die bereits zur Blockierung dieser Spaltstelle entworfen worden war und die bereits im pR1228 getestet worden ist und die Prozessierung nicht verhindern konnte. Auch im verkürzten Konstrukt trat das p23/2 unverändert in Erscheinung. Mit den Klonen 1332 a und b sollten zwei andere Dipeptide (DN 933/934 und DR 936/937) als mögliche Spaltstellen getestet werden und zudem auch die alternative Nutzung des bereits analysierten Dipeptids QG ausgeschlossen werden. Es stellte sich heraus, dass die Mutation Q940P völlig ohne Einfluss war und beide Klone kein p23/2 ergaben, also die Spaltung verhindert war. Mit den Klonen 1334 a und b sollte die mögliche Spaltung im Dipeptid DV (943/944) analysiert werden. Eine Mutation an dieser Position hatte aber keinerlei Einfluss auf die Spaltung, da das p23/2 unverändert nachweisbar war. Mit dem Klon 1334 c sollte das Dipeptid DQ (939/940) als Spaltstelle ausgeschlossen werden. Auch mit der in diesem Klon enthaltenen Mutation konnte die Spaltung nicht verhindert werden. Die Interpretation war allerdings erschwert, da bei diesem Ansatz aufgrund eines experimentellen Problems die Expression insgesamt erheblich schwächer war, als bei den übrigen Klonen. Dies ist daran erkenntlich, dass auch das p41 nur relativ schwach nachweisbar war. Berücksichtigt man dies, so ist klar, dass die relativ schwache Bande des p23/2 in diesem Experiment für eine nicht nennenswert verminderte Spaltung stand.

Mit den folgenden Klonen 1334 d – j sollte die Spaltstelle durch Mutation einzelner Kodons endgültig identifiziert werden. Bereits mit dem Klon 1334 d, der die Mutation D936H trägt, war kein p23/2 mehr nachweisbar, also die Spaltung am N-Terminus von p5/p18 blockiert. Der Klon 1334 e (D939G) diente zur Komplettierung des Satzes der Mutationen in diesem Bereich. Nach den bisher beschriebenen Ergebnissen war zu erwarten, dass auch dieser Klon das Spaltpattern des Wildtyps zeigte. Im Klon 1334 f war wiederum die Asparaginsäure an Position 936 verändert und auch das Glutamin an Position 940. Auch in diesem Fall war kein p23/2 mehr nachzuweisen. Mit den Klonen 1334 g, h und j wurde die mögliche Spaltstelle DR (936/937) weiter untersucht. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass alle Konstrukte, bei denen Asparaginsäure 936 zu Histidin oder Glycin bzw. das Arginin 937 zu Prolin verändert war und nur Konstrukte mit Veränderungen an diesen Positionen eine Blockierung der fraglichen Prozessierung zeigten. Damit liegt die Vermutung nahe, dass das Dipeptid DR (936/937) die Spaltstelle am N-Terminus von p5/p18 darstellt. In der folgenden Abbildung 10 sind die Ergebnisse dieser Experimente zusammengefasst.

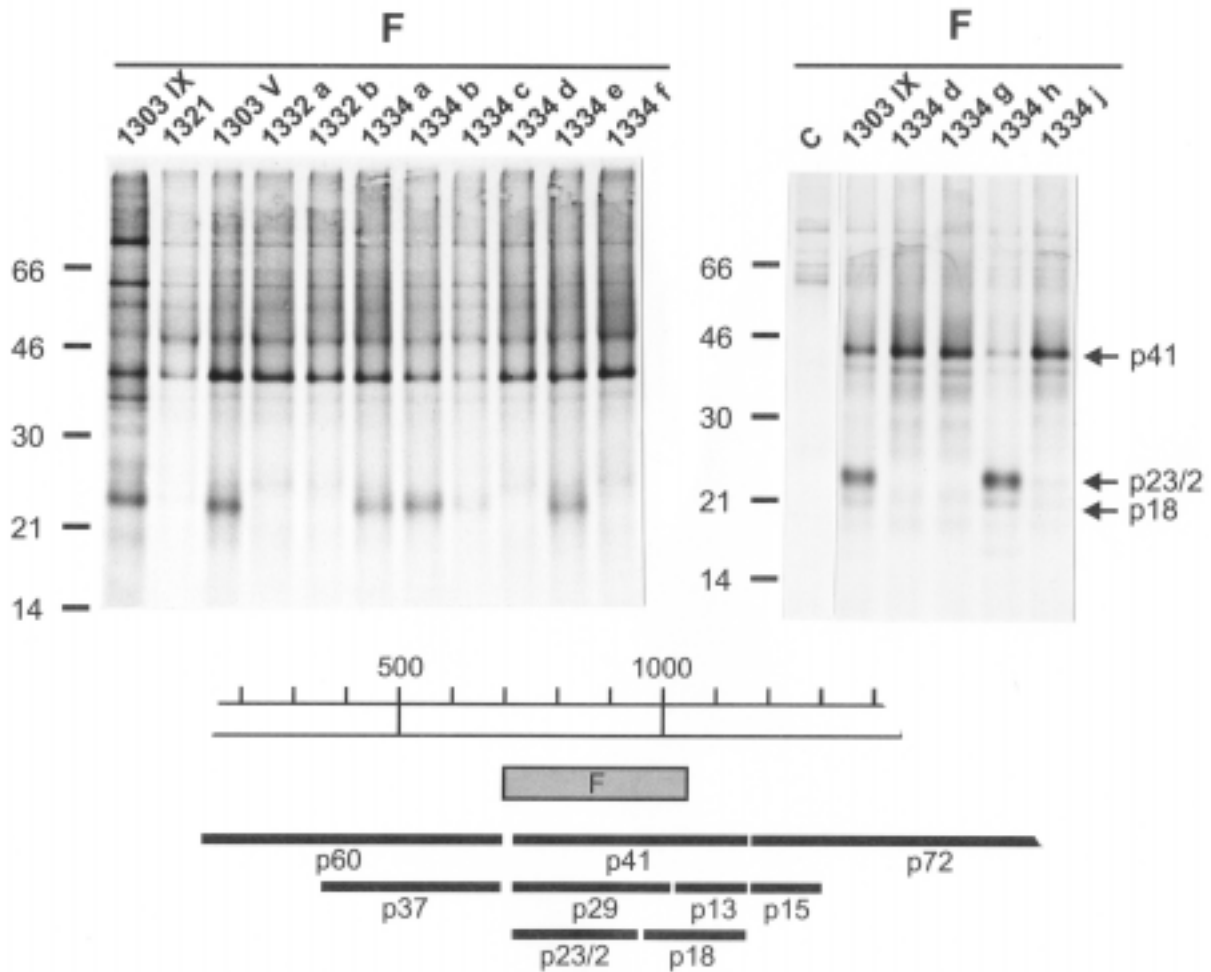


Abb. 10: Radioimmunpräzipitationen mit dem verkürzten RHDV-Konstrukt 1303 IX und verschiedenen davon abgeleiteten Mutanten (vgl. Tab. 2). Zur Erklärung des Antiserums vgl. Abb. 4, Etablierung pR1228. Da die Durchführung des Experiments in verschiedenen Ansätzen erfolgte, sind die Klone 1303 IX als wt-Kontrolle und 1334 d als blockierte Mutante in beiden Abbildungsteilen vertreten. Man erkennt im rechten Teil auch das p18 durchaus noch, während dies im linken Teil kaum noch möglich ist. Mit dem Antiserum F liegt dies aber im Bereich der normalen Schwankungen.

In der obigen Abbildung 10 wurden Bilder mit dem Antiserum F vorgestellt. Die entsprechenden Klone wurden immer mit allen Antiseren getestet und die Ergebnisse waren analog. Da keine neuen Erkenntnisse gewonnen wurden, wurde nur jeweils ein repräsentatives Gel ausgewählt und vorgestellt. Zusammenfassend kann man festhalten, dass im gewählten Testsystem (1303 IX und Mutationen in diesem Konstrukt) die p5/p18-N-terminale Spaltstelle durch das Dipeptid DR an der Aminosäureposition 936/937 im RHDV-ORF1-Polypeptid dargestellt wurde. Dieses Dipeptid ist aber nicht charakteristisch für die RHDV-Protease-Spaltstellen. Damit ergibt sich der Verdacht, dass diese Spaltung – als einzige - nicht durch die virale Protease erfolgt.

Überprüft werden sollte dies in einem Ansatz, bei dem untersucht werden sollte, ob die Prozessierung in Abwesenheit der viralen Protease erfolgt. Zu Kontrollzwecken wurde die Analyse als „trans-Spaltungssystem“ angelegt, d. h. das jeweilige Konstrukt mit der p41-kodierenden Sequenz wurde einmal separat und einmal zusammen mit der RHDV-Protease exprimiert. Als p41-Konstrukt wurde ein Plasmid exprimiert, dessen kodierender Bereich kurz vor dem p41 begann (so wie die Klone in Tab. 2), aber exakt mit dem C-Terminus dieses Proteins endete. Um das System besser überprüfen und auswerten zu können, wurden für die Spaltexperimente zwei fast identische Substrat-Konstrukte aufgebaut (1416 a, b). Bei 1416 b war die RHDV-Sequenz von der SacI-Schnittstelle bis zum Ende des p41 völlig unverändert, während bei 1416 a die N-terminale Spaltung am p41 unterbunden war. Auch für das die Protease exprimierende Konstrukt wurden zwei Alternativen erzeugt. Dabei wurde zum einen nur die Protease exprimiert (Klon 862) und zum anderen ein Protease-Polymerase Fusionsprotein (1418). Dies sollte berücksichtigen, dass diese beiden Protease-Formen unterschiedliche Substratspezifitäten besitzen könnten, wie es bei Picornaviren beschrieben ist (Rueckert 1996). Auch die Klonierung der Konstrukte, die in diesem Abschnitt verwendet wurden, führte Dr. G. Meyers durch.

Bei der Analyse zeigte sich, dass bei Expression von 1416 a oder b eine Spaltung zu beobachten war, ohne dass parallel ein Protease-Konstrukt exprimiert wurde. Neben einer Bande von etwa 43 kDa, die dem ungespaltenen Expressionsprodukt entsprach, war eine Bande von ungefähr 25 kDa zu beobachten. Nach den Randbedingungen musste es sich dabei um das N-terminale Fragment von 1416 a/b handeln. Es war also genau die Spaltstelle am N-Terminus von p5/p18 betroffen. Dies wurde durch die Experimente der Doppeltransfektionen mit Protease bestätigt. Dabei wurde mit 1416 b wie erwartet p41 erzeugt und p23 freigesetzt. Das 25-kDa-Produkt war nicht mehr nachweisbar. Die letztgenannte Bande blieb aber erhalten, wenn 1416 a zusammen mit der Protease exprimiert wurde. Die beiden unterschiedlichen Protease-Konstrukte ergaben in diesen Analysen gleiche Ergebnisse. Die folgende Abbildung 11 zeigt die beschriebenen Daten.

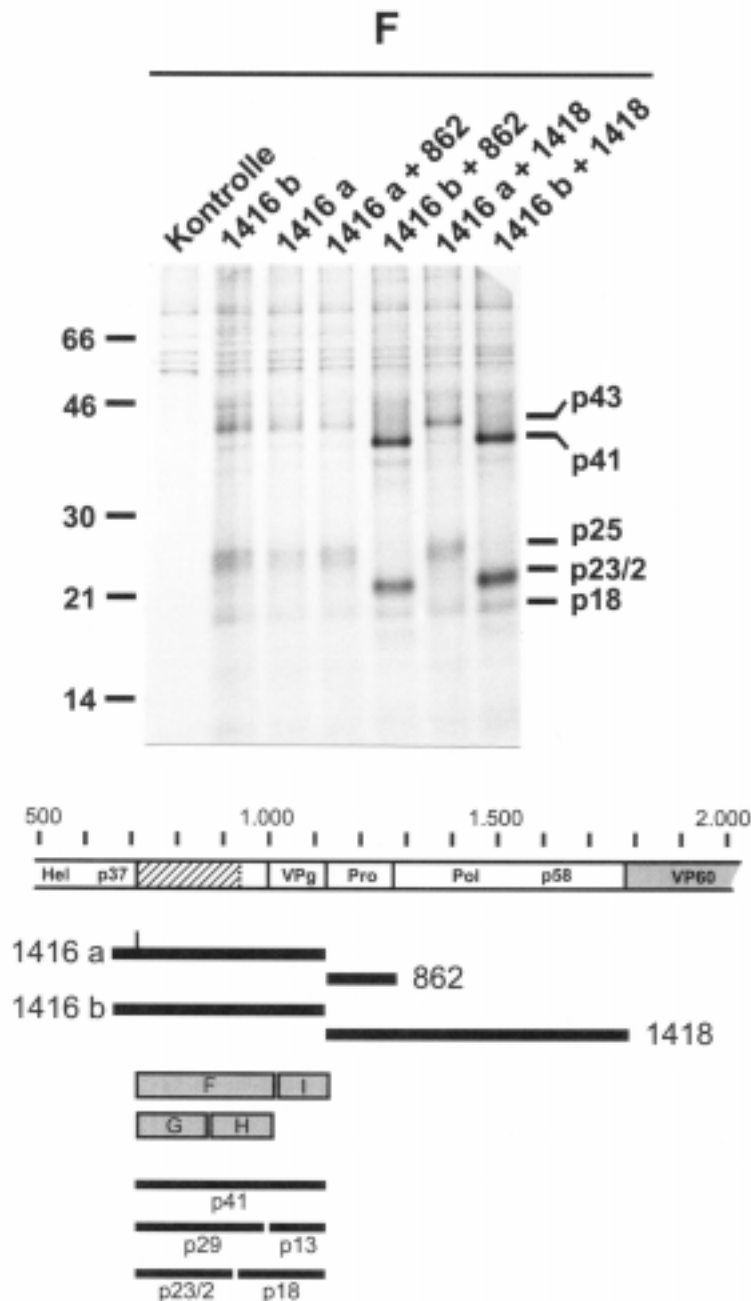


Abb. 11: Analyse zur Spaltung am N-Terminus des p5/p18 in einem trans-Spaltungsansatz. Die verwendeten Klone sind im Text beschrieben. Als scharfe Banden erkennt man p23/2 und p41, die Produkte p43 und p25 sind deutlich unschärfer. Der Aufbau der Abbildung ist ähnlich zu Abb. 4. Oben das Serum, dessen Zuordnung zu den bekannten Spaltprodukten ganz unten erfolgt (F in grauem Block). Unter der Autoradiografie des Gels und einem Maßstab in Aminosäureresten ist der relevante Abschnitt des ORF1-Polypeptides dargestellt. Im entsprechenden Balken sind die Proteine, z. T. mit Größenangaben, eingetragen. Der dargestellte Strukturproteinbereich ist grau unterlegt. Zwischen dem ORF1-Polypeptid und den Seren sind die verwendeten Klone als schwarze Balken dargestellt. Bei 1416 a symbolisiert der kurze senkrechte Strich die blockierte Spaltung am N-Terminus von p41 (vgl. Text).

So bleibt als Ergebnis festzuhalten, dass wahrscheinlich auch die letzte noch verbliebene Spaltstelle der Polyproteinprozessierung bei RHDV identifiziert wurde und dass die Spaltung an dieser Position nicht durch die virale 3C-ähnliche Protease erfolgt.

3.2 Ergebnisse zum FCV

Um vergleichende Studien zur Genomorganisation und zur Genexpressionsstrategie von Caliciviren durchführen zu können, wurde mit Arbeiten zum FCV begonnen. Erste Voraussetzung waren Analysen zum viralen Genom.

3.2.1 FCV-2024 Sequenz

3.2.1.1 cDNA-Bibliothek

Die virale RNA ist aufgrund ihrer Labilität und der nur eingeschränkten Manipulierbarkeit mittels molekularbiologischer Methoden nur wenig geeignet für die weitergehende Charakterisierung des Virusgenoms. Daher wurde zunächst die gereinigte FCV-RNA in cDNA überführt. Zunächst wurde mit einer retroviralen Reversen Transkriptase und einem Oligo-dT-Primer ein zur Ausgangs-RNA komplementärer DNA-Strang erzeugt, der sog. 1. Strang der cDNA. Durch die RNase H-Funktion der Reversen Transkriptase wurden Teile der RNA im DNA/RNA-Hybrid abgebaut. Verbliebene RNA-Bruchstücke wurden durch DNA-Polymerase I verlängert und im weiteren Verlauf der Synthese vollständig durch DNA ersetzt (Synthese des 2. Stranges). Die Enden der Produkte wurden mit Klenow-Polymerase geglättet, die EcoRI-Adaptoren für die folgende Klonierung anligiert und die 5'-OH-Enden phosphoryliert. Nach einer Größenselektion mittels Agarosegelelektrophorese wurde die cDNA in einen veränderten λ -Phagen kloniert (λ -ZAPII-System). Diese Konstrukte wurden *in vitro* in Phagenpartikel verpackt. Mit den Phagen wurden entsprechend vorbereitete *E. coli* XL 1 blue infiziert und die Zellen dann ausplattiert. Ein Teil der erhaltenen Phagen wurden auf Replika-Filter übertragen. Nach Lyse der Phagen und Bindung der DNA an die Nylon-Membranen erfolgte die Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde, bei der es sich um ein PCR-Produkt aus der Mitte des FCV-Genoms (Polymerase-Region) handelte. Nach dieser Hybridisierung, die analog zum Northern Blot ablief, wurden positive Plaques durch Autoradiografie detektiert und auf den Bakterienplatten lokalisiert. Die entsprechenden Phagen-Plaques wurden ausgestochen und die Phagen eluiert, verdünnt, erneut plattiert und nochmals wie oben analysiert. Positive Plaques wurden ausgestochen und einer *in vivo* Excision unterworfen, bei der durch einen Helferphagen (R408) die klonierte cDNA zunächst als M13-Phage erhalten wurde und dann nach Infektion von Bakterien in ein pBluescript-Plasmid mit der FCV-cDNA überführt wurde. Durch Plattieren auf Ampicilin/X-Gal/IPTG-Platten wurden

Bakterien selektiert, die Plasmide mit Insertion enthielten. Entsprechende Kandidaten wurden isoliert, vermehrt und die Plasmid-DNA mit Standardmethoden analysiert.

Da die Herstellung der cDNA-Bibliothek mit einem dT-Oligonukleotid als Primer begonnen wurde, müssten (theoretisch) alle Klone 3'-coterminal zur viralen RNA sein. Durch die Größenselektion und eine Hybridisierungssonde, die im Polymerase-Gen angesiedelt war, sollten nur Klone identifiziert werden, bei denen das 5' Ende der Insertion stromaufwärts der 5.000sten Base des FCV-Genoms lag. Zur weiteren Analyse der Klone wurden die terminalen Sequenzen der Insertionen bestimmt und mit der Sequenz des FCV-Urbana-Stammes verglichen.

Die Analyse einer großen Zahl von cDNA-Klonen führte dabei zu folgenden Ergebnissen: Die große Mehrheit der Klone endete tatsächlich im 3' Bereich des FCV-Genoms, allerdings waren keine oder nur wenige Adenine des Poly-A-Schwanzes, den das FCV-Genom nativ trägt, in der cDNA enthalten. Die 5' Enden auffällig vieler Insertionen lagen vor etwa 3,5 kb. Es wurde kein cDNA-Klon mit kontinuierlicher Sequenz gefunden, der vor Nukleotid 2.450 des FCV-Genoms beginnt. Aus den Daten ist zu schließen, dass vermutlich die Synthese des 1. Stranges der cDNA aufgrund von Sekundärstrukturen im terminalen Drittel der RNA vorzeitig abbrach.

3.2.1.2 RT-PCR

Da keine Klone mit mehr als 5,2 kb Insert erhalten wurden, wurde versucht, den 5' Bereich des Genoms auf andere Weise in cDNA zu überführen. Aus Vergleichen der publizierten Sequenzen (vgl. Tabelle im Anhang) war bekannt, dass das 5' Ende des FCV-Genoms streng konserviert ist. Zum anderen war über einen der erhaltenen cDNA-Klone die Nukleotidsequenz ab nt 2.480 bekannt. Der Bereich 2-2,4 kb wurde durch einen weiteren Klon abgedeckt, der allerdings in seinem weiteren Verlauf eine Deletion im Vergleich zum FCV-Genom enthielt. Somit waren alle Voraussetzung erfüllt, um eine RT-PCR durchführen zu können, die ein Produkt mit etwa 2,5 kb liefern sollte. Verwendet wurden hierzu die Primer FCV10 und FCV12. Es wurde das erwartete ~2,4 kb-Fragment erhalten, das in pBluescript kloniert wurde.

3.2.1.3 Sequenzierung

Über die Standard-Primer-Bindungsstellen (m13-fwd/-rev) im pBluescript-Vektor war die Bestimmung der terminalen Sequenzen der klonierten cDNA-Fragmente möglich. Mit dem ABI377-System konnten je Sequenzierung bis zu 700 Basen mit hoher Qualität gelesen werden. Aus den dann zugänglichen neuen Sequenzdaten wurden Oligonukleotid-Primer abgeleitet und mit diesen die Fragmente weiter sequenziert. Durch die Verwendung verschiedener

cDNA-Klone und die direkte Sequenzierung von RT-PCR-Produkten wurde sichergestellt, dass jedes Nukleotid der abgeleiteten FCV-2024-Konsensus-Sequenz zumindest zweimal unabhängig sequenziert wurde.

Grund für die Ermittlung der Sequenz mehrerer unabhängiger cDNA-Fragmente ist die Variabilität der Sequenzen von RNA-Viren, die durch die hohe Fehlerrate der RNA-Polymerase bedingt ist. Hinzu kommen Fehler bei der Erstellung der cDNA. Es ist daher erforderlich, aus verschiedenen unabhängigen Sequenzen eine Art Konsensus-Sequenz zu erstellen.

3.2.1.4 FCV-2024 Sequenz

Das Genom der FCV-2024-Quasispezies besteht aus 7.681 Nukleotiden. Es gliedert sich in einen 5'-nicht-translatierten Bereich (Nukleotid 1-19) und einen 3'- nicht-translatierten Bereich (Nukleotid 7.638-7.681), an den sich der Poly-A-Schwanz mit unbekannter Länge anschließt. Der Protein-kodierende Bereich (Nukleotid 20-7.637) gliedert sich in 3 ORFs. Der erste ORF, Nukleotid 20-5.311, enthält die Nicht-Struktur-Proteine. Der ORF2 kodiert für den Hauptkapsidprotein-Vorläufer (Nukleotid 5.314-7.320), und ist im Raster -1 zum ORF1 verschoben. Der dritte ORF kodiert im dritten möglichen Leserahmen für das minore Kapsidprotein VP10 (Nukleotid 7.317-7.637), und überlappt mit ORF2 im Bereich von 4 Nukleotiden (Positionsangaben inklusive der Stop-Kodons). Im grundsätzlichen Aufbau entspricht das Genom des Stammes 2024 den bereits veröffentlichten FCV-Sequenzen anderer Stämme (vgl. Anhang).

3.2.2 Infektiöser cDNA-Klon

Als Basis für die *de novo* Erzeugung von infektiösem FCV ausgehend von klonierten cDNA Sequenzen sollte ein Plasmid aufgebaut werden, das die gesamte genetische Information des Virus als cDNA-Insertion enthielt. Ziel war es von diesem Konstrukt *in vitro* eine RNA zu transkribieren, die nach Transfektion in Zellen die Bildung neuer Viren steuern sollte.

3.2.2.1 Etablierung eines geeigneten Plasmid-Vektors

Bei den Versuchen, einen FCV-Gesamtklon aufzubauen, zeigte sich, dass dies in pBluescript nicht möglich war. Ursache dürfte hier wohl die Instabilität der klonierten Sequenzen in diesem „high-copy“-Plasmid sein. Da die Virus-Sequenz Startkodons und mit hoher Wahrscheinlichkeit auch kryptische Promotorsequenzen enthält, könnten Virusproteine entstehen. Falls diese oder cDNA-Sequenzen mit besonderen Sekundärstrukturen für die Bakterien toxisch sind gibt es zwei Alternativen: Die Bakterien verändern die Sequenz; es entsteht ein „fal-

scher“ Klon oder die Bakterien gehen zu Grunde und man erhält keine Klone. Beide Effekte wurden beobachtet.

Eine Möglichkeit, dieses Problem zumindest zu verringern, besteht in der Verwendung von „low-copy“-Plasmiden. Da bei ansonsten gleichen Umständen nur 5-10 % der Plasmid-DNA in der Zelle vorhanden ist, ist der Druck auf die Bakterien entsprechend geringer. Als Ausgangsvektor wurde pACYC177 gewählt. Aus diesem Plasmid wurde die Kanamycin-Resistenz und flankierende Sequenzen entfernt und dafür eine „multiple cloning site“ (MCS) über ein gepaartes Oligonukleotid eingeführt. Durch diese Veränderung verkleinert sich der Vektor von 3.940 Basen auf 2.268 Basen und er enthält nur noch das Ampicillin-Resistenzgen; als Replikationsursprung dient der p15a-origen, der für eine geringe Kopienzahl verantwortlich ist. Die MCS wurde über die Restriktionsschnittstellen NheI und BamHI eingeführt, die beide dabei wegfielen. In der 5' nach 3' Orientierung von pACYC177 wurden folgende Schnittstellen, z. T. überlappend, eingeführt:

EcoRV-KpnI(Acc65I)-XhoI-EcoRI-SmaI(XmaI/PspAI)-BamHI-XbaI-SacI-NotI-SphI-NsiI.

Im Verlauf der Gesamtklon-Erstellung erwies es sich als notwendig den Vektor pACYC-MCSI nochmals zu verändern, da die SacI-Schnittstelle sich als äußerst hinderlich erwies. Der Vektor wurde mit den Restriktionsendonukleasen NotI und XmaI gespalten, die überhängenden Enden aufgefüllt und nach 5'-Phosphorylierung religiert. Es entstand pACYC-MCSII. Das Klonierungsprodukt wurde im veränderten Bereich durch Sequenzierung verifiziert.

3.2.2.2 Aufbau des Gesamtklons

Aus der cDNA-Bank war ein Klon verfügbar, der den Bereich von etwa Nukleotid 2.400 bis zum Ende mit einem Adenin vom Poly-A-Schwanz abdeckte (pMP9_3). Systembedingt liegen alle diese Klone in die EcoRI-Schnittstelle inseriert vor. Um die biologische Funktion gewährleisten zu können, musste ein Poly-A-Schwanz nicht genauer definierter Länge vorhanden sein. 32 Adenine, eine SspI-Schnittstelle, die zur Linearisierung bei der *in vitro*-RNA-Transkription benötigt wird, wurden über das PCR-Oligonukleotid FCV43 mittels einer EcoRI-Schnittstelle eingeführt. Das Vorwärts-Oligo dazu war FCV42, das eine XbaI-Schnittstelle für eine mögliche Subklonierung enthält und eine BglII-Schnittstelle, die aus dem FCV-Genom stammt. Dieses PCR-Produkt wurde mit den Enzymen XbaI und EcoRI in pBluescript subkloniert (pFCV-PolyAI). Nach Behandlung mit den Enzymen BglII und EcoRV konnte dieses PCR-Fragment in den cDNA-Klon pMP9_3 eingefügt werden. Mit einer RT-PCR (RT-PCR25) mit den Oligonukleotid FCV10 und FCV12 wurde das 5'-Ende des Genoms in cDNA überführt und über die Schnittstellen KpnI(Acc65I) (FCV12) und PstI (FCV10) in pBluescript

subkloniert. Leider war im Bereich von Nukleotid 2.050 bis 2.300, der zwischen dem längsten cDNA-Klon und diesem RT-PCR-Produkt überlappte, keine verwertbare Restriktionsschnittstelle vorhanden. Somit war es notwendig einen der beiden Klone zu verlängern. Dazu wurde zunächst über RT-PCR mit den Oligonukleotiden FCV9 und FCV12 ein 2,8 kb-Fragment erzeugt, das über eine Agarosegelelektrophorese gereinigt wurde. Mit diesem Fragment als PCR-Matrize wurde mit den Oligonukleotiden FCV9 und FCV18 der Bereich Nukleotid 1.300 bis 2.810 amplifiziert (PCR197). Das erhaltene Fragment konnte über die PstI- und die KpnI(Acc65I)-Schnittstellen der Oligonukleotide in pBluescript subkloniert werden. Im Vektor pQE32 wurden die Fragmente RT-PCR25 und PCR197 zu einem Klon (pLanger-FCV-N-Terminus) zusammengesetzt, der das 5' Ende des FCV-Genoms abdeckte. Der Vektor war doppelt gespalten worden mit KpnI und PstI und dephosphoryliert. Das RT-PCR-Fragment, das den T7-Promotor und das 5'-Ende des Genoms einbringt, war doppelt gespalten mit KpnI und NheI und das PCR-Fragment, das den Bereich 1,3-2,8 kb abdeckte, wurde NheI und PstI gespalten. Mit diesem Klon war es möglich über eine weitere 3-Fragment-Ligation den FCV-Gesamtklon in pACYC-MCSII (vorbereitet mit Acc65I und EcoRV) zusammensetzen. Die Fragmente wurden über Doppelspaltungen mit Acc65I und BstEII bzw. BstEII und EcoRV eingeführt. Das resultierende Plasmid (pIK12) hat eine Größe von ca. 10 kb.

In Abbildung 12 sind einige wesentliche Charakteristika des FCV-Gesamtklon und Daten zum FCV-Genom zusammengefasst:

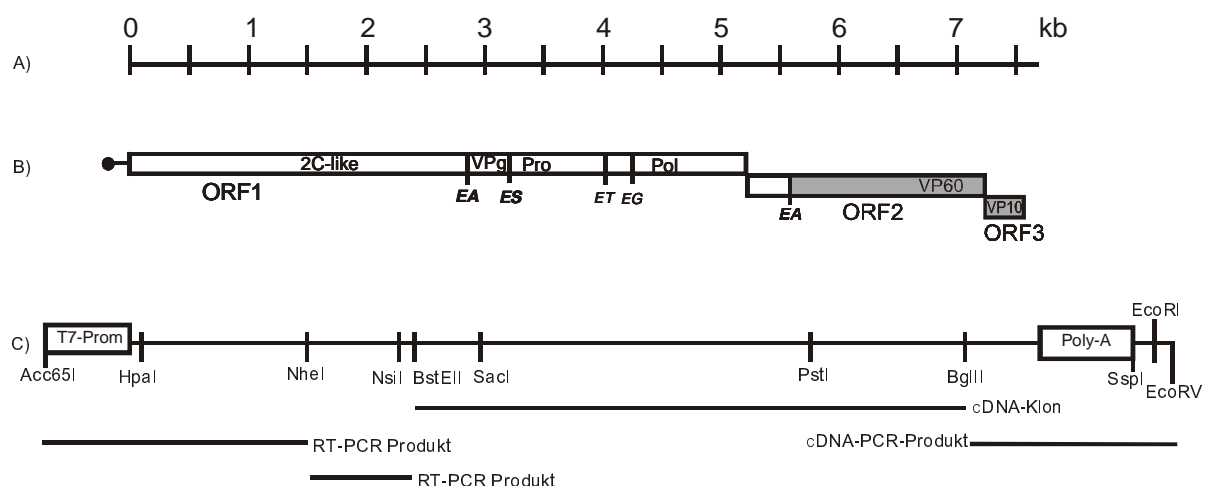


Abb. 12: Der infektiöse FCV-cDNA-Klon basiert auf einem langen cDNA-Fragment aus einer selbst hergestellten cDNA-Bibliothek. 3'-terminal wurden ein Poly-A-Schwanz und geeignete Klonierungsschnittstellen über PCR eingefügt. Die 5'-terminalen 2,4 kb wurden über RT-PCR von viraler RNA erhalten. Dabei wurde auch der T7-Promotor mit einer Restriktionsschnittstelle eingeführt. A) DNA-Längenmaßstab, B) FCV-Genom-Schema, C) Aufbau des infektiösen Klonbaus mit ausgewählten Restriktionsschnittstellen.

Die Genomorganisation und die bekannten Protease-Schnittstellen (im Ein-Buchstaben-Aminosäure-Kode) sind der Literatur entnommen (Sosnovtsev und Green 1995; Clarke und Lambden 1997; Sosnovtseva et al., 1999). Der T7-Promotor und der Poly-A-Schwanz sind dabei nicht maßstabsgerecht dargestellt. Am Genomanfang ist in B) das VPg als schwarzer Punkt dargestellt. Nicht fett dargestellte Spaltstellen im ORF1-Polyprotein führen wahrscheinlich zu aberranten Spaltungen.

3.2.2.3 Unterscheidung wt-FCV2024 und infektiöser Klon

Ein Teil des FCV-Genoms wurde mit Hilfe des Primers FCV18 kloniert. Dabei wurde über das Oligonukleotid eine Punktmutation bei Nukleotid 1.309 von A zu G eingeführt. Dadurch wird die Aminosäure, die durch dieses Kodon bestimmt wird, aber nicht verändert; es handelt sich also um eine stumme Mutation. Damit ist es möglich, die vom infektiösen Klon pIK12 abgeleitete Sequenz von der wt-FCV-Sequenz zu unterscheiden, ohne dabei das Risiko einzugehen, die biologische Funktion zu verändern.

3.2.2.4 Nachweis der Infektiosität von RNA, die von pIK12 abgeleitet wurde

Die Möglichkeit, einen infektiösen Klon auf Nukleinsäureebene zu erstellen, beruht bei (+)-Strang-RNA-Viren auf der Tatsache, dass diese Viren bei einer Infektion lediglich auf die RNA, nicht aber auf irgendein Enzym angewiesen sind. Eine solche RNA ist prinzipiell aus klonierter cDNA durch *in vitro* Transkription zugänglich. Dabei muss eine „cap“-Struktur durch ein „cap“-Analog bei der Transkription eingeführt werden und ein Poly-A-Schwanz auf der Ebene der DNA bereits enthalten sein, falls diese Strukturen für die Funktion der viralen RNA erforderlich sind.

Als Erschwernis bei Caliciviren bleibt zu bedenken, dass deren RNA kein „cap“ trägt, sondern ein VPg, das nur schwerlich an eine *in vitro* hergestellte RNA angefügt werden kann. Allerdings ist bereits gezeigt worden (Sosnovtsev und Green, 1995), dass bei FCV das VPg durch eine „cap“-Struktur ersetzt werden kann. Es sind aber vermutlich Einschränkungen bei der Effizienz der Gewinnung infektiöser Viren nach RNA-Transfektion zu erwarten, weil das VPg höchstwahrscheinlich Funktionen hat, die das „cap“-Analog nicht kompensieren kann.

Mit dem cDNA-Gesamtklon als Matrize wurde die *in vitro* Transkription durchgeführt und anschließend die gebildete RNA durch denaturierende Agarosegelelektrophorese überprüft; dabei wurden 3,5 µl des Transkriptionsproduktes (insgesamt 25 µl je Ansatz) aufgetragen. Es wurden Transkriptionen mit und ohne „cap“-Analog durchgeführt.

Zur Transfektion von CRFK-Zellen mit den erhaltenen RNAs wurden verschiedene Methoden getestet: SuperFect-Reagenz, LipofectAMINE-Reagenz und Lipofectin-Reagenz. Dabei wur-

de jeweils nach den Hersteller-Angaben verfahren. Transfiziert wurden Zellen in 3,5 cm Schalen, die ca. 60 % konfluent waren. Jeweils 3 μ l des Transkriptionsansatzes wurden eingesetzt. Als Positiv-Kontrolle wurden ca. 2 μ g RNA verwendet, die aus wt-FCV infizierten Zellen gewonnen worden war; als Negativ-Kontrolle diente der jeweilige Transfektionsansatz ohne RNA. Dabei stellte sich heraus, dass SuperFect für diese Anwendung nicht geeignet ist. Lipofect-AMINE und Lipofectin lieferten vergleichbare Ergebnisse. Aus Kostengründen wurde daher im Weiteren nur mit Lipofectin RNA transfiziert.

Die Auswertung der Transfektionsexperimente erfolgte einfach über die Beobachtung der Zellen. Ein positives Ergebnis war zu verzeichnen, wenn eine Lyse der Zellen zu beobachten war. Aufgrund der Effizienz der FCV-Vermehrung war es möglich, einzelne positive Ereignisse noch nachzuweisen. Bei der Transfektion mit wt-RNA war in allen Fällen der Beginn des cpe 8 h nach der Transfektion zu sehen und die Zellen der Mini waren nach 16-24 h komplett lysiert. Bei den Ansätzen mit der *in vitro* hergestellten RNA trat der vollständige cpe jeweils etwa 1-1,5 Tage später auf. Dies deutete bereits darauf hin, dass die RNA aus *in vitro* Transkription in Bezug auf die Generierung nicht die selbe Effizienz besitzt, wie die wt-RNA. Nach einmaligem Passagieren der entstandenen Viren wurde aus den infizierten CRFK-Zellen RNA isoliert. Nach RT-PCR und Sequenzierung wurde nachgewiesen, dass infektiöse Viren, die nach Transfektion der *in vitro* transkribierten RNA erhalten wurden, die für pIK12 typische Mutation an Position 1.309 enthielten und somit Kreuz- oder Fremdkontaminationen auszuschließen waren.

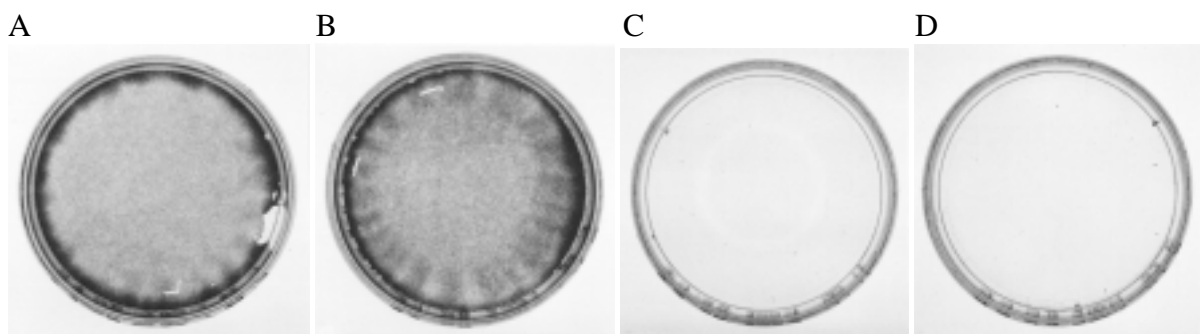


Abb. 13: Test der *in vitro* transkribierten RNA.

Es wurde in der 1. Passage auf Lyse von CRFK-Zellen getestet, da so der Nachweis infektiöser Viren geführt werden konnte, ohne dass Effekte der Transfektion (cpe auch durch das Lipofectin) störten. Es wurden jeweils 50 μ l des Überstandes der Transfektion nach 24 h zur Infektion einer CRFK-Gewebekulturschale eingesetzt. Nach Kristallviolett-Färbung erscheint ein intakter Zellrasen dunkel gefärbt und lysierte Zellen ergeben keine Färbung. A) Test des Überstandes aus dem Kontrollansatz mit unbehandelten CRFK-Zellen; B) Test der Transfektion von RNA des infektiösen Klons ohne „cap“-Struktur als negative Kontrolle; C) Test der Transfektion von RNA des infektiösen Klons mit „cap“-Struktur, die von pIK12 abgeleitet war und D) Infektion mit FCV2024 als positive Kontrolle.

3.2.3 Charakterisierung des infektiösen FCV-Klons

Um das Virus, das vom infektiösen FCV-Klon abstammte, weiter zu charakterisieren wurden die Eigenschaften mit denen von wt-FCV verglichen. Beide Viren wurden auf CRFK-Zellen vermehrt und der Titer des erhaltenen Lysats bestimmt. Dabei ergab sich aus einer 4-fach Bestimmung für beide Viren ein Titer von etwa $7,5 \times 10^7$. Ausgehend von diesen Virusstocks wurden Wachstumskurven aufgenommen (aus jeweils Doppelbestimmungen). Dabei wurden $1,3 \times 10^7$ Zellen mit 3×10^3 Viren, was einer m.o.i. von 0,00023 entspricht, infiziert, auf 3,5-cm-Gewebekulturschalen verteilt und inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Kulturüberstände in Eppendorf-Gefäße überführt und die noch lebenden Zellen durch Einfrieren bei -70°C , Tauen bei 37°C und erneutes Einfrieren lysiert. Dabei wurden die evtl. noch vorhandenen intrazellulären Virionen freigesetzt. Grobe Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation abgetrennt und die erhaltenen Überstände dann wie üblich titriert. Dabei zeigte sich, dass beide Viren einen Titer von 10^8 pfu/ml erreichten und auch der Verlauf der Virusvermehrung sehr ähnlich ist. Man kann also davon ausgehen, dass das vom infektiöse Klon abgeleitete Virus dem wt-FCV in den biologischen Eigenschaften weitgehend entspricht. Die Abbildung 14 dokumentiert das Ergebnis im Bild und verdeutlicht, welcher fulminanten Verlauf die FCV-Replikation in der Zellkultur nimmt.

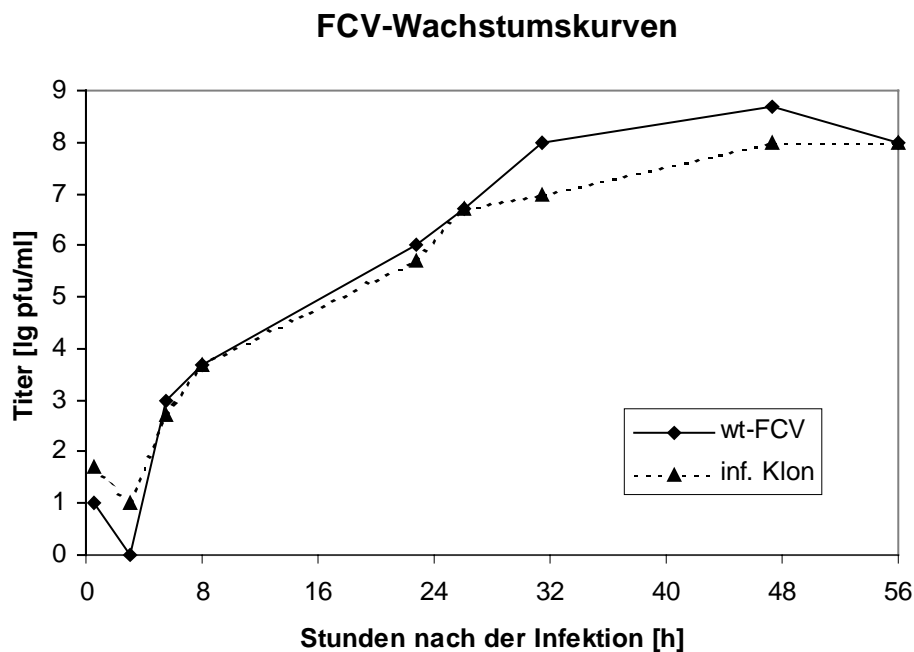


Abb. 14: Grafische Darstellung der Wachstumskurve von wt-FCV und infektiösem FCV-Klon auf CRFK-Zellen nach Infektion mit einer m.o.i. von 0,00023 und Standard-Kulturbedingungen. Am Ende der Titration sind keine lebenden Zellen mehr in der Kultur vorhanden. Die jeweiligen Titer wurden aus Doppelansätzen bestimmt.

Der Verlauf der Kurve lässt verschiedene Phasen erkennen. Nach 30 Minuten, was der Bearbeitungszeit für alle Ansätze entspricht, wurde ein Titer von 100 bzw. 500 pfu/ml bestimmt. Die geringeren Werte 3 h p. i. sind darauf zurückzuführen, dass nach der Infektion von Zellen die Viruspartikel zerlegt worden waren, also nicht mehr als infektiöse Einheiten in Erscheinung traten, zu diesem Zeitpunkt aber noch kein neues Virus gebildet worden war. Der Titer sinkt also gegenüber dem Start-Wert ab, idealerweise auf Null (oder angemessener: Unter die Nachweisgrenze). In der Vermehrungsphase ab etwa 5,5 Stunden erkennt man ein exponentielles Wachstum, wie es für Viren zu erwarten ist. Dies geht ab ca. Stunde 40 in ein Plateau über. Für FCV erklärt sich dies dadurch, dass bereits in den Infektionszyklen zuvor alle CRFK-Zellen infiziert worden waren und nun keine Wirtszellen mehr zur Vermehrung zur Verfügung standen. Im Rahmen dieser Untersuchung zeigte sich kein signifikanter Unterschied von wt-FCV und infektiösem Klon. Beide wuchsen ähnlich mit für Viren relativ großen Vermehrungsraten zu hohen Titern. Der leichte Abfall beim wt-FCV gegen Ende repräsentiert vermutlich eine Messwert-Ungenauigkeit und noch keine Inaktivierung. Der Prozess der Hitzeinaktivierung wurde untersucht und führt bei FCV erst nach 4-7 Tagen bei 37°C zur Abnahme um eine Größenordnung. Dies wird auch durch Stabilitätsuntersuchungen von wt-FCV in Meerwasser bei verschiedenen Temperaturen gestützt (Kadoi und Kadoi, 2001). Die vergleichbaren Wachstumseigenschaften des vom infektiösen Klon abgeleiteten Virus zeigen, dass das hergestellte Konstrukt keine gravierenden Fehler aufweist.

3.2.4 Transfektions-Effizienz von RNA

Nach Charakterisierung des Klons sollte die Transfektionseffizienz der *in vitro* transkribierten RNA mit „cap“-Analog mit der entsprechenden Effizienz der wt-RNA verglichen werden. Zuerst wurden CRFK-Zellen in 24-Loch-Platten mit verschiedenen RNA-Mengen nach dem Lipofectin-Protokoll transfiziert. Eingesetzt wurden vom Transkript 3,0; 1,0; 0,25 µl und weitere Verdünnungen. Die Konzentration der RNA war zuvor mit 250 ng/µl photometrisch bestimmt worden. Es ergab sich, dass nur die 3-µl-Ansätze sicher zur Bildung von FCV führten; schon bei den Ansätzen mit 1 µl entstand nur noch in einem von drei Ansätzen FCV. Um sicher zu einer erfolgreichen Transfektion mit *in vitro* transkribierter RNA mit „cap“ zu gelangen, sind also mindestens 600 ng des Gesamt-Transkripts einzusetzen.

Mit der wt-mRNA wurde ein ähnliches Experiment durchgeführt. Dabei wurden 0,5 µl unverdünnter RNA eingesetzt und je 1 µl einer 1:10; 1:100; 1:1.000 und 1:10.000-Verdünnung. Die ursprüngliche RNA-Konzentration war dabei 14 µg/µl. Allerdings war zusätzlich zur genom-

schen RNA auch subgenomische und zelluläre RNA enthalten. Es zeigte sich, dass noch mit der 1:10.000-Verdünnung erfolgreich transfiziert werden konnte. Aufgrund der optischen Beobachtung des Experiments, konnte davon ausgegangen werden, dass auch mit der höchsten Verdünnungsstufe noch 2-5 Plaques erzeugt wurden.

Der zweite Versuchsteil bestand in der Abschätzung der Menge der tatsächlich vorhandenen genomischen RNAs vollständiger Länge, wie es in den Methoden unter 2.2.13 dargestellt ist. Für das RNA-Gel wurden von jeder RNA (wt- bzw. *in vitro* Transkription) 6 Verdünnungen eingesetzt: Je 3,0 und 0,5 µl der ursprünglichen RNAs, sowie je 1,0 µl einer 1:5; 1:10; 1:20 und 1:50-Verdünnung. Nach der Auswertung am Phosphoimager ergab sich, dass für die *in vitro* transkribierte RNA nur ungefähr 13 % der gesamten RNA in der Bande der richtigen Größe vorlagen. Und für diese blieb zu bedenken, dass wahrscheinlich nur etwa 10 % tatsächlich mit „cap“-Struktur versehen worden waren. Aus dem Vergleich mit dem direkten Transfektions-Test ergibt sich damit, dass etwa 8 ng *in vitro* transkribierter RNA aus einem Reaktionsansatz mit „cap“-Analog für eine erfolgreiche Transfektion erforderlich waren. Für die RNA aus FCV-infizierten Zellen ergab sich, dass noch 1,4 ng zu 2-5 Transfektionsereignissen führten. Entsprechend der Ergebnisse der Phosphoimager-Auswertung sind 2,5 % der RNA aus infizierten Zellen FCV-RNA der genomischen Länge, so dass dies 35 pg FCV-RNA der vollen Länge ausreichen, um eine erfolgreiche Transfektion zu gewährleisten. Damit ist die FCV-RNA um einen Faktor von ca. 3×10^2 effizienter bei der Transfektion als die *in vitro* transkribierte RNA. Diese Berechnung basiert auf der Annahme, dass alle FCV-RNA-Moleküle das VPg tragen. Wenn das nicht der Fall wäre, würde sich das Verhältnis nochmals zuungunsten der *in vitro* transkribierten RNA verschieben. Mit hoher Wahrscheinlichkeit ist der Unterschied in den Effizienzen auf das Fehlen des VPg am 5' Ende der RNA zurückzuführen, das durch das „cap“-Analog nicht kompensiert werden konnte.

3.2.5 Produktion infektiöser FCV-Partikel

Oben ist gezeigt worden, dass es möglich ist, ausgehend von cDNA infektiöse FCV-RNA zu gewinnen. Dieses System ist teuer und „handwerklich“ aufwendig, da RNase-frei gearbeitet werden muss. Einfacher wäre es, DNA zu transfizieren und davon ausgehend dann intakte infektiöse Virionen zu erhalten.

Beim infektiösen FCV-Klon handelt es sich um ein Konstrukt mit T7-Promotor. Die Transkription der FCV-RNA ist also an das Vorhandensein von T7-Polymerase gebunden. Da keine Zelllinien zur Verfügung standen, die die T7-RNA-Polymerase konstitutiv exprimieren,

musste die Polymerase über Vaccinia-MVA-T7 bereit gestellt werden. Etabliert war dieses System für die BHK-21-Zellen. Ein mögliches Problem dabei war, dass in den BHK-Zellen, die natürlicherweise nicht permissiv für FCV sind, wohl die RNA generiert werden könnte, aber einer der nachfolgenden Schritte bei der Erzeugung von infektiösen Viren nicht ordnungsgemäß hätte ablaufen können. Andererseits war für CRFK-Zellen aus den Transfektionsversuchen bekannt, dass die FCV-Replikation ausgehend von intakter RNA normal abläuft, allerdings war nicht bekannt, ob sich diese Zellen mit MVA-T7 infizieren lassen, da dieses Virus ein sehr eingeschränktes Wirtsspektrum besitzt. Es wurde daher parallel mit BHK- und CRFK-Zellen gearbeitet.

In der praktischen Durchführung der SuperFect-Transfektion bestanden keine Unterschiede zu den bereits beschriebenen Versuchen bei RHDV. Dabei zeigte sich, dass die CRFK-Zellen mit Vaccinia-MVA-T7 infizierbar waren. Nachdem dies klar war, war nicht überraschend, dass die CRFK-Zellen auch infektiöse Virionen erzeugten. Auch bei den BHK-Zellen war es nach Vaccinia-MVA-T7-Infektion und cDNA-Transfektion möglich, die Bildung infektiöser Partikel nachzuweisen (Abb. 10 und 11).

Der Nachweis konnte nicht direkt erfolgen, da beide Zelllinien auch durch das als Helfervirus verwendete Vaccinia-MVA zu Grunde gehen und zudem die BHK-Zellen nicht permissiv für das FCV sind. Um dies zu umgehen, wurden die Zelllysate (nicht gezeigt) und die jeweiligen Kulturüberstände der Transfektionsansätze nach Inkubation für 16 h durch Filtration (0,1 µm) von Vaccinia- Virionen befreit. Dabei wurde ausgenutzt, dass Vaccinia sehr große Viruspartikel bildet, während Caliciviren nur Partikel mit einem Durchmesser von 30-40 nm bilden. Mit je 150 µl der gereinigten Überstände wurde versucht, „frische“ CRFK-Zellen zu infizieren. Als Kontrolle dienten jeweils CRFK- bzw. BHK-Zellen, die parallel zu den Transfektionsansätzen nur mit Vaccinia-MVA infiziert worden waren, aber nicht mit DNA transfiziert wurden und anschließend wie die transfizierten Ansätze aufbereitet wurden. Die Abbildung 10 zeigt, dass bei diesen Infektionsversuchen die Überstände der nur mit Vaccinia infizierten Zellen nach der Filtration und Infektion keinen cpe bei CRFK-Zellen auslösen konnten. Damit ist gezeigt, dass die Vaccinia-Virionen mit dieser Methode tatsächlich vollständig abtrennbar waren. Auch sah man, dass die Überstände der cDNA-Transfektion sehr wohl in der Lage waren, die Bildung von Plaques auszulösen. Nicht dargestellt ist, dass dieser Effekt zeitlich fortschreitet und das ursächliche Agens passagierbar war. Nicht überraschend war dabei, dass im homologen System (CRFK-Zellen) der Prozess der FCV-Bildung effektiver ablief als in den BHK-Zellen, wie man an der größeren Zahl von Plaques beim CRFK-System ablesen konnte.

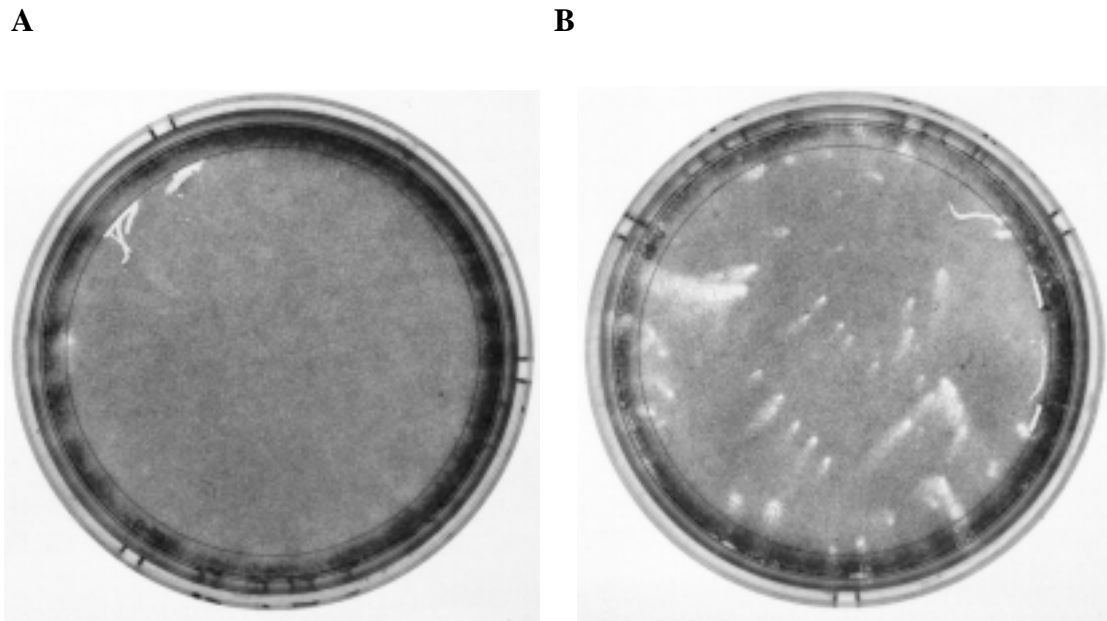


Abb. 15 A, B: Legende auf der folgenden Seite nach Abb. 15 C und D.

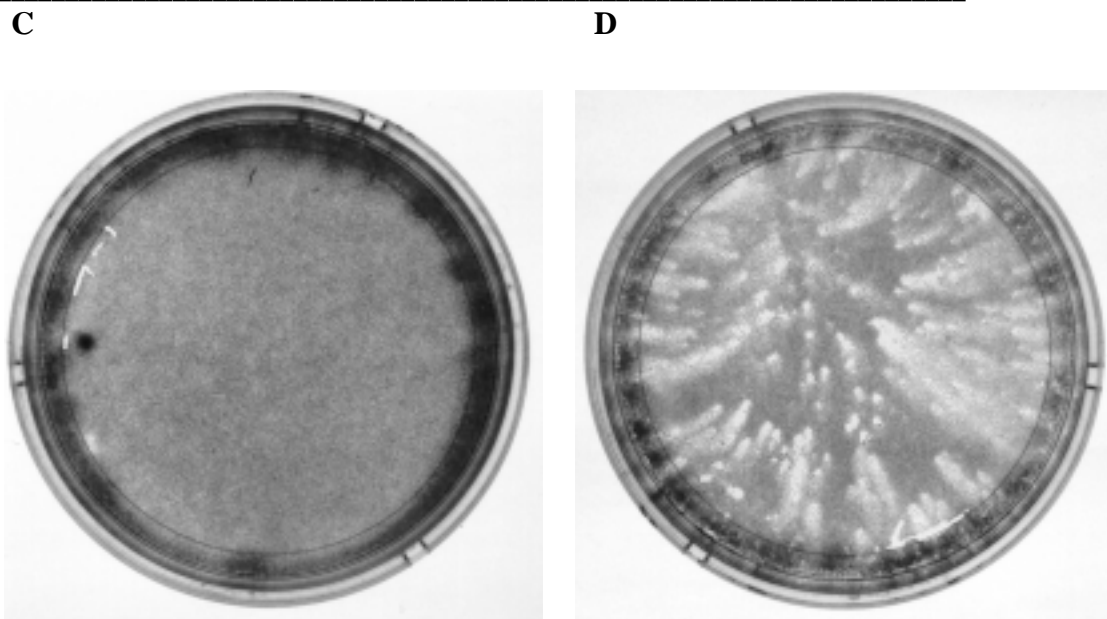


Abb. 15: Kristallviolett-färbungen von Kulturschalen mit CRFK-Zellen. Die Schalen wurden mit 150 μ l filtriertem Kulturüberstand der ursprünglichen DNA-Transfektionsansätze in BHK-Zellen (B) und CRFK-Zellen (D) infiziert und 20 h inkubiert. Als Kontrollen dienten parallel zu den Transfektionen lediglich mit Vaccinia-MVA infizierte Zellen. Auch bei diesen Ansätzen wurde das Vaccinia-MVA-Virus durch Filtration nach 16 h Inkubation entfernt und je 150 μ l dieses Überstandes zu CRFK-Zellen gegeben (A: Überstand aus BHK-Zellen ohne Transfektion; C: Überstand aus CRFK-Zellen ohne Transfektion).

Nachdem gezeigt war, dass der cpe durch ein passagierbares Agens verursacht wurde, das durch Filtration nicht abtrennbar war, musste noch demonstriert werden, dass es sich dabei

um FCV handelte. Dazu wurde ein identisches Experiment zur Expression von FCV-cDNA nach Vaccinia-MVA-T7-Infektion in BHK-Zellen angesetzt wie oben beschrieben. Allerdings wurden die „Nachweisschalen“ mit CRFK-Zellen nicht mit Kristallviolett gefärbt, sondern mit spezifischen Antikörpern inkubiert, deren Bindung über eine Peroxidase-Färbung nachgewiesen wurde. Auch bei diesem Ansatz wurden die Zellen bei Erreichen eines deutlich sichtbaren cpe mit Aceton/Methanol fixiert. Die Zellen wurden dann rehydriert. Ein polyklonales anti-FCV-Antiserum aus Kaninchen wurde als erster Antikörper eingesetzt und sollte die FCV-infizierten Zellen erkennen. Zur Detektion wurde ein zweiter Antikörper (Ziege-anti-Kaninchen) verwendet, der mit dem Enzym Peroxidase konjugiert war. Dieses Enzym setzt das Färbesubstrat Aminoethylcarbazol zu einem braunen Niederschlag um und markiert so indirekt die FCV-infizierten Zellen.

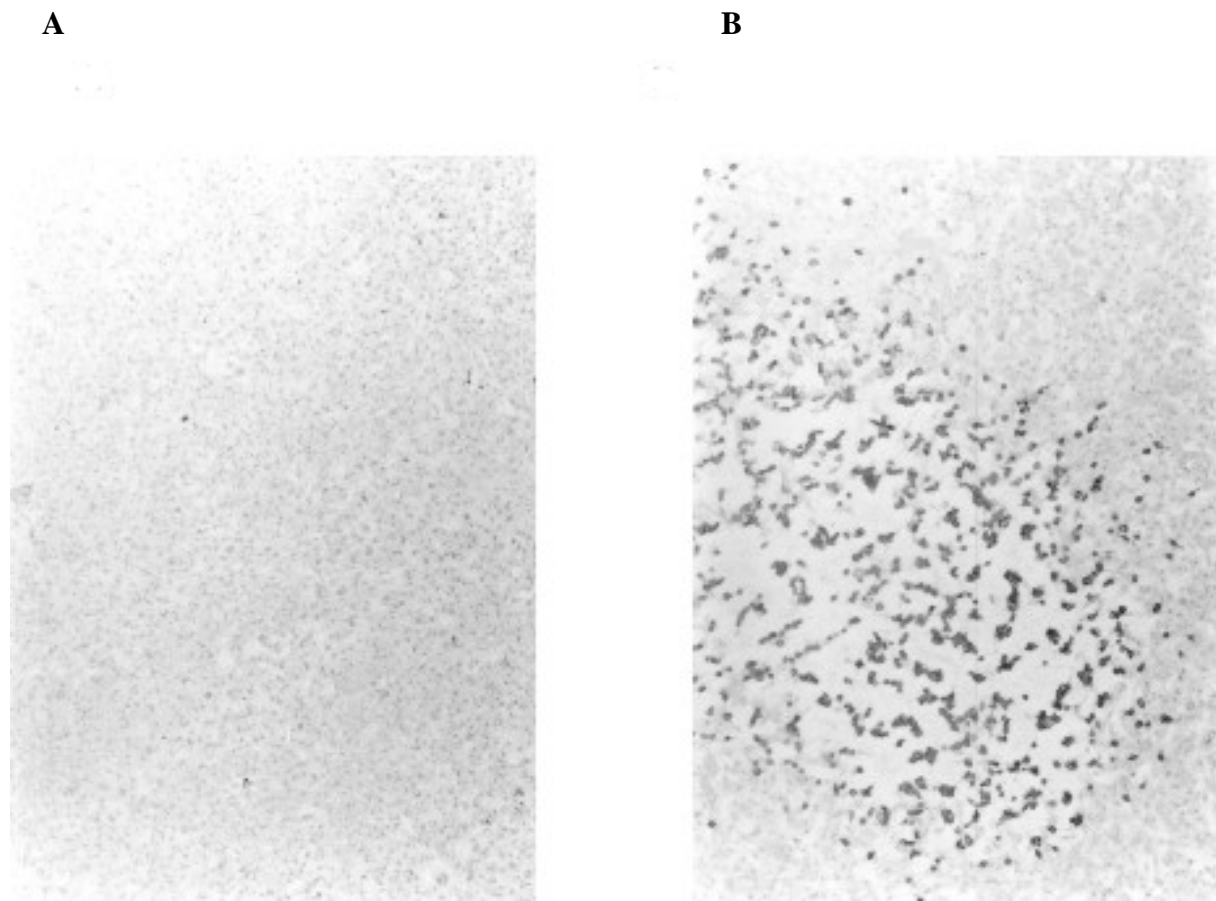


Abb. 16: Peroxidase-Färbung zum Nachweis von FCV nach Transfektion des infektiösen Klons. Zum Nachweis, dass der cpe tatsächlich durch neu gebildetes FCV verursacht wurde, wurden BHK-Zellen nach Vaccinia-MVA-Infektion mit cDNA transfiziert und 16 h inkubiert. Als Kontrolle dienten BHK-Zellen, die nur infiziert, aber nicht transfiziert worden waren. Die Überstände wurden durch Filtration von Vaccinia-MVA befreit. Mit 200 µl der Überstände wurde jeweils eine Schale infiziert und inkubiert. Als bei dem Ansatz mit dem FCV-Gesamtklon eindeutig Plaques zu erkennen waren, wurden die Zellen fixiert (Aceton/Methanol) und FCV-infizierte Zellen durch indirekte Immunfärbung nachgewiesen. Zellen nach Infektion mit dem Kontrollüberstand sind negativ auf FCV und zeigen keinen cpe (A), Zellen nach Infektion mit dem Überstand der Transfektion zeigen cpe und noch vorhandene Zellen im Bereich der Plaques sind positiv für FCV (B).

Es konnte so gezeigt werden, dass in zwei verschiedenen Zelllinien FCV-Viren erzeugt werden können, deren Integrität durch den Nachweis der Passagierbarkeit und deren Identität durch Immunfärbung bewiesen wurde. Die permissive Eigenschaft von Zelllinien ist daher wahrscheinlich nicht stoffwechselbedingt, sondern beruht wohl eher auf Prozessen, die die Aufnahme des Virus in die Zellen betreffen.

3.2.6. Etablierung eines FCV-Replikons

Unter einem viralen Replikon versteht man eine Nukleinsäure, die sich sehr ähnlich zu einer viralen Erbinformation verhält indem sie in einer Zelle autonom repliziert. Im Unterschied zu einem Virusgenom ist ein Replikon aber nicht in der Lage, einen vollständigen Replikationszyklus zu steuern, so dass eine Zelle, die ein Replikon beherbergt, keine infektiösen Viren freisetzen kann. Unter besonderen äußeren Umständen kann aber ein Replikon in Viruskapside verpackt werden und dann auch andere Zellen infizieren. Replikons haben für eine Reihe von Untersuchungen Vorteile, weil sie die Analyse der RNA-Replikation ohne die Kopplung an die Generierung von Viruspartikeln erlauben. Um in Zukunft entsprechende Experimente durchführen zu können, sollte deshalb versucht werden, ein FCV-Replikon zu etablieren. Nicht per definitionem notwendig, aber sehr sinnvoll für diese Absicht ist die Einführung eines einfach zu detektierenden Markers.

Für diesen Versuch wurde als Marker das GFP („green fluorescent protein“) aus dem Vektor pEGFP-N3 gewählt. Bei diesem GFP lässt sich die grüne Fluoreszenz mit jedem Fluoreszenzmikroskop beobachten. Das GFP-Gen wurde, nach einer Subklonierung in pCITE2a (EcoRI/NotI), über eine im FCV-Genom vorhandene PstI-Schnittstelle (nt 5.714) am Anfang der für VP60 kodierenden Region eingeführt. Das GFP-Gen befindet sich im Leseraster des ORF2 und wird durch ein Stop-Kodon terminiert. Dadurch wird auch die Expression des VP60 unmöglich, so dass die Bildung von Viruspartikeln unterbleiben muss, da kein funktionelles Kapsidprotein mehr zur Verfügung steht. Unverändert blieb dagegen der ORF1, so dass alle NSP wie im Wildtyp exprimiert werden sollten. Damit konnte angenommen werden, dass alle für die RNA-Replikation und Expression erforderlichen viralen Funktionen erhalten blieben.

Der veränderte FCV-Gesamtklon (pFCV-GFP) wurde in CRFK-Zellen transfiziert und mittels Vaccinia-MVA exprimiert. Als Kontrollen dienten die Transfektion eines GFP-Expressionskonstruktes pK13 als positiv-Kontrolle und die Transfektion von pIK12 als negativ-Kontrolle. Sowohl für die positiv-Kontrolle wie für pFCV-GFP konnte nach 15 Stunden

die GFP-Fluoreszenz nachgewiesen werden (Abb. 17, oben), während pIK12 kein Signal ergab. Allerdings waren bei pFCV-GFP weniger positive Zellen zu detektieren, diese zeigten durch ihre abgekugelte Form bereits Anfänge eines cpe. Dies war zu erwarten, denn die Detektion von GFP-Fluoreszenz sollte bei pFCV-GFP von der Expression der subgenomischen mRNA abhängen, die wiederum nur erfolgen sollte, wenn RNA-Replikation stattfindet. Wie für pIK12 gezeigt wurde, war dies nur in einem relativ geringen Prozentsatz der transfizierten Zellen der Fall. Die Abkuglung der Zellen kann als cpe in Folge der Replikation gedeutet werden.

Ein mögliches Problem, das zu falsch positiven Ergebnissen hätte führen können, bestand darin, dass der ORF2, in den das GFP eingefügt war, in MVA-infizierten Zellen irregulär exprimiert wurde und so GFP entstand, ohne dass FCV-Replikation ablief. Um dies zu untersuchen, wurde im FCV-GFP-Klon im NSP-Bereich bei Aminosäure 692 ein Stop-Kodon eingeführt. Durch dieses Stop-Kodon, das weit vor dem VPg liegt, sollte eine Expression der RNA-Polymerase verhindert werden und die Replikation unterbunden sein. Die Transfektion dieses Klons sollte nicht mehr zu GFP-leuchtenden Zellen führen. Tatsächlich gab es erheblich weniger fluoreszierende Zellen, als beim originalen FCV-GFP-Klon (Daten nicht gezeigt). Mit hoher Wahrscheinlichkeit ist es also beim FCV-GFP-Replikon zur Replikation gekommen.

Ein anderes Problem könnte z. B. eine Rekombination von Vaccinia mit der GFP-Sequenz sein. Dann wäre die GFP-Produktion nicht mehr von der FCV- sondern von der Vaccinia-Replikation abhängig. Um dies auszuschließen, wurde ausgehend vom FCV-Replikon versucht, infektiöse Partikel zu erzeugen, die auch GFP produzieren, aber unabhängig von der T7-Polymerase sind. Zu diesem Zweck wurden der GFP-Klon und der infektiöse FCV-Klon zusammen in Vaccinia-MVA-infizierte Zellen transfiziert.

Es war zu hoffen, dass das vom FCV-Klon resultierende Kapsidprotein dann auch die Replikon-RNA in Partikel verpackt, so dass auch infektiöse Replikon-Partikel entstehen. Parallel sollten natürlich auch normale FCV-Virionen gebildet werden. Die Kotransfektion der beiden Plasmide ergab, wie erwartet, GFP-Fluoreszenz in der Anwesenheit von MVA (vgl. Abb. 17, oben), die ab etwa 15 Stunden nach Beginn des Experiments zu beobachten war. Zur Überprüfung der Bildung von infektiösen Replikon-Partikeln wurden die Überstände der Gewebekulturen geerntet, Vaccinia-frei filtriert und zur Infektion von CRFK-Zellen eingesetzt. Auch nach der Passage waren nach 15 Stunden einzelne grün leuchtende Zellen zu erkennen, allerdings erheblich weniger als bei direkter Transfektion der entsprechenden cDNA. Damit darf als gesichert gelten, dass der FCV-GFP-Klon repliziert und in Anwesenheit eines Helfervirus

in Partikel verpackt wird. Die Partikel mit der GFP-Replikon-RNA waren aber gegenüber den wt-Viren stark unterrepräsentiert. Das defekte Virus war nicht zu reinigen, da bei weiteren Passagen der infektiöse FCV-Klon offensichtlich weiterhin erheblich effizienter gebildet wurde, so dass bereits in der zweiten Passage keine GFP-Expression mehr zu beobachten war.

In der folgenden Abbildung 17 sind die Versuche zum GFP-Replikon zusammengefasst. Als GFP-Positiv-Kontrolle diente ein Klon (pK13) der die GFP-Sequenz im pCI-Vektor enthält. Dieser Klon führte nach Transfektion zu ca. 60 % GFP-exprimierenden Zellen, und wie erwartet war in der ersten Passage kein Signal mehr nachweisbar. Der infektiöse Klon ohne GFP-Sequenz bildete natürlich auch kein entsprechendes Protein. Der GFP-Klon alleine führte zu 5-10 % transfizierten und GFP-exprimierenden Zellen, aber auch hier war das GFP-Signal nicht übertragbar. Die Doppeltransfektion führte zu ebenfalls 5-10 % GFP-exprimierenden Zellen direkt nach Transfektion. Auch nach einer Passage waren in diesem Fall noch durchschnittlich 500 positive Ereignisse nachzuweisen. Die erste Passage war also zweifelsfrei positiv, doch aufgrund der geringen Effizienz, ließen sich immer nur sehr wenige GFP-positive Zellen der ersten Passage auf einem Bild darstellen. So wurden zur Validierung der Daten 4 unabhängige Experimente ausgezählt und der Mittelwert bestimmt. Die Zellen des Transfektionsansatzes sind durch das Vaccinia-Virus alle im Zustand der Lyse; bei der 1. Passage traf dies auch für den Ansatz mit pIK12 + pFCV-GFP und den Ansatz nur mit pIK12 zu, da bei diesen auch intaktes FCV entstanden war.

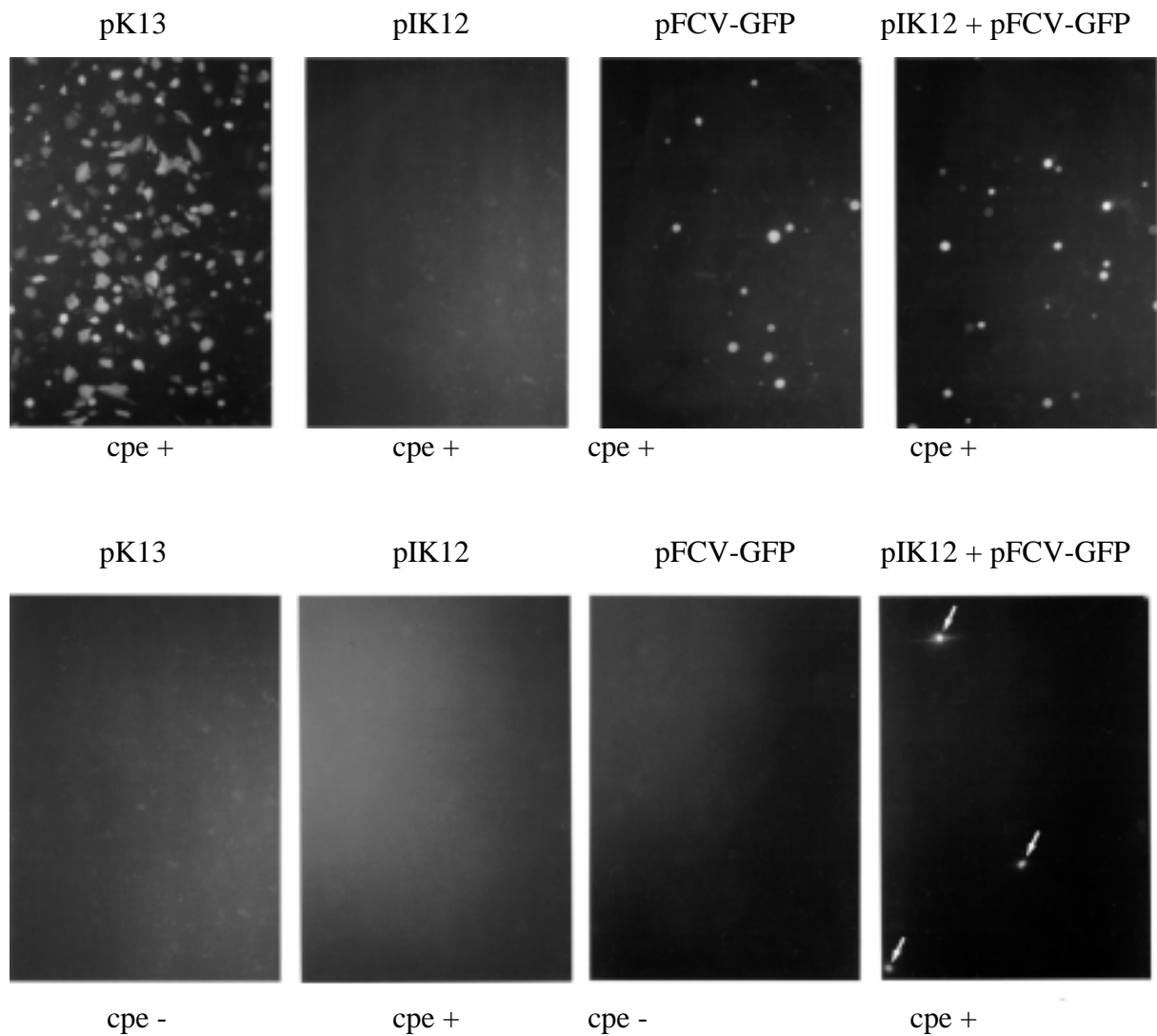


Abb. 17: Transfektionsversuch zum GFP-Replikon.

Die obere Reihe zeigt das Ergebnis des Transfektionsexperiments: Über den Fluoreszenzbildern die Bezeichnung der Klone, darunter der beobachtete cpe (+/-). Der untere Block zeigt die entsprechenden Ergebnisse in der ersten Passage. Die transfizierten CRFK-Zellen waren durch Frieren/Tauen aufgeschlossen worden. Das Vaccinia-MVA-Virus wurde durch Filtration entfernt. 200 µl Filtrat wurden zur Infektion in der 1. Passage eingesetzt.

3.3 Polyklonale anti-FCV-Seren

Das FCV ist hervorragend in der Zellkultur vermehrbar und bietet daher alle Möglichkeiten für virologische und molekularbiologische Analysen. Es stehen zudem ein infektiöser Klon (Sosnovtsev und Green, 1995) und mehrere publizierte vollständige Sequenzen (Neill et al., 1991; Tohya et al., 1991a; Carter et al., 1992; Oshikamo et al., 1994) zur Verfügung. Tatsächlich liegen aber nur wenige Informationen zur Molekularbiologie vor. Die Daten zur Polyproteinprozessierung und zur Genomorganisation sind nicht nur nicht vollständig, sondern diese Prozesse sind auch weniger gut untersucht als beim vom System erheblich aufwendigeren RHDV (Clarke und Lambden, 1997). Grund für diese Diskrepanz ist, dass lange Zeit spezifische Seren nur gegen wenige virale Proteine zur Verfügung standen.

Um für weitere Untersuchungen die Grundlagen zu legen, mussten spezifische Antikörper gegen verschiedene Abschnitte des ORF1-Polyproteins erzeugt werden, um so die Prozessierungs(end)produkte einzeln darstellen zu können. Dazu wurden ausgewählte Abschnitte des ORF1-Polyproteins mittels PCR amplifiziert. Die erhaltenen Fragmente wurden dann in Expressionsplasmide kloniert, um anschließend in Bakterien die entsprechenden Polypeptide herzustellen. Dabei waren zwei Optionen vorhanden. Im pQE-System wurden nach Induktion mit IPTG Fusionsproteine mit N-terminalem His₆-„tag“ hergestellt, während im pEx-System durch Temperaturverschiebung induziert Fusionsproteine entstanden, die N-terminal 99 Aminosäuren der Polymerase des MS-2-Phagen tragen, gefolgt von der jeweiligen FCV-Sequenz. Diese Proteine wurden gereinigt und zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt. Die Spezifität der dadurch erzeugten polyklonalen Antiseren wurde mittels Radio-Immün-Präzipitationen (RIP) getestet. Die Sequenzabschnitte des Polyproteins wurden in Anlehnung an die bekannte Lokalisation der RHDV-Proteine ausgesucht (Wirblich 1995; König et al., 1998; Meyers et al., 2000) und sollten das gesamte Genom abdecken, sich aber möglichst nicht überschneiden. Für den zentralen Bereich des ORF1, der dem RHDV-p41 entspricht, wurde eine größere Anzahl von Seren geplant, um detaillierte Analyse dieses wichtigen Bereichs zu erleichtern.

3.3.1 PCR-Produkte und Expressionsklonierung

Die PCR-Reaktionen wurden nach dem Standard-Protokoll ausgeführt. Als Matrize für die PCR wurden zwischen 2 und 12 ng DNA eingesetzt. Dabei wurden z. T. verkürzte Gesamt-

klone (Teile, die beim Aufbau des Gesamtklon entstanden waren) oder der Gesamtklon pIK12 eingesetzt. Für diese Anwendung ergaben sich keine Unterschiede in den Ergebnissen.

Für das pQE-System wurden über die PCR-Primer Schnittstellen für Acc65I und PstI eingeführt, so dass nach Behandlung mit diesen Enzymen die Fragmente mit entsprechend behandelte Plasmid-DNA ligiert werden konnten. Durch den Aufbau der pQE-MCS war es möglich vom pQE-System direkt in die pEx-Vektoren umzuklonieren (BamHI/PstI). Die erhaltenen Klone wurden durch Sequenzierung verifiziert. Tabelle 3 fasst die Daten für die Klonierungen zusammen:

FCV-Seren	RHDV-Analog ¹	nt in wt-FCV	Primer	Vektor	Protein AS	Produkt kDa
A	p16	20 - 390	FCV14 / 15	pQE 30	140	17
C	p37	1.290 – 2.200	FCV18 / 19	pQE 30	260	29
E	p30	2.211 – 2.877	FCV40 / 21	pEx 36a	225	25
F	p41-Mitte	2.420 – 2.695	FCV Seq f 2.420 / r 2.695	pQE 32	92	10
G	VPg	2.970 – 3.240	FCV22 / 23	pEx 36b	110	12
H	Pro	3.254 – 3.580	FCV34 / 35	pQE 30	130	15
I	Pol	4.260 - 5.200	FCV36 / 37	pQE 30	310	34
J	„Leader“- VP60	5.316 – 5.687	FCV44 / 45	pEx 36a	130	15
K	VP60 ²	6.510 – 6.760	(FCV28 / 29)	pEx 36a	90	10
L	VP10	7.326 – 7.634	FCV34 / 31	pQE 30	110	12
B1	p23	500 – 1.062	FCV16 / 17	pEx 36a	210	24
B2	p23-hinten ³	750 – 1.062	(FCV16 / 17)	pEx 36a	120	12
D1	Übergang ⁴	1.940 – 2.480	FCV38 / 39	pEx 36c	160	19

¹ : RHDV-Protein, dem die gewählte Sequenz möglicherweise entsprechen könnte

² : Beim Umklonieren von VP60 wurde das ursprünglich PCR-Produkt durch BamHI intern gespalten und auf ca. 270 nt verkürzt

³ : Um die Chance für eine erfolgreiche Proteinexpression zu verbessern, wurde das ursprüngliche PCR-Fragment mit SalI gespalten und der hintere Anteil subkloniert

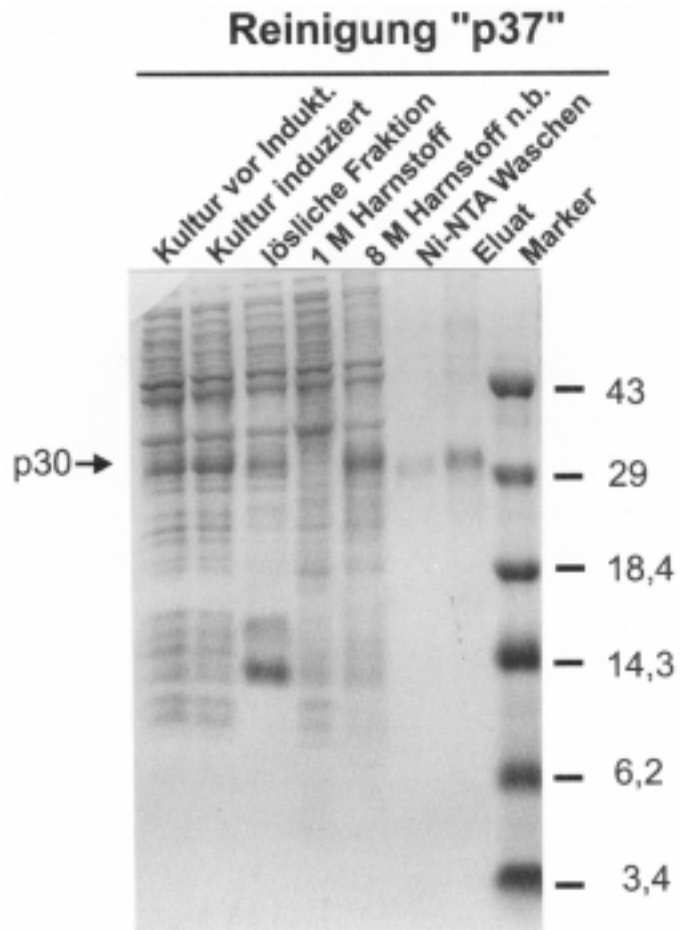
⁴ : Übergang entspricht formal dem Bereich des Übergangs von p37 zu p41 beim RHDV

Tab. 3: Zusammenfassung der Daten zur Klonierung und Expression der Proteine für die Immunisierung von Kaninchen zur Gewinnung von polyklonalen Antisera gegen FCV-Proteine.

3.3.2. Proteinreinigungen

Die Proteine für die Immunisierung der Kaninchen wurden nach den beschriebenen Verfahren gereinigt. Alle pQE-Klone von 3.3.1 wurden aus *E. coli* XL1-blue gereinigt. Nachdem die entsprechenden Kulturen (200 ml LB_{Amp}) eine OD₆₀₀ von 0,8 erreicht hatten, wurde mit 1 mM IPTG die Expression induziert. Die Reinigung durch Bindung an die Metall-Affinitätsmatrix (Ni²⁺-NTA-Agarose) erfolgte im „batch“-Verfahren. Abschließend wurden die Zielproteine mit 250 mM Imidazol eluiert und die Proteinkonzentration nach der Methode von Bradford, 1976, bestimmt. Die Kontrolle der Reinigung erfolgte mit PAGE. Die folgende Abbildung 18 zeigt als Beispiel dafür das Protein für das Antiserum C:

Abb. 18: Kontrolle der Reinigung des Proteins zur Erzeugung des „p37“-Serums (Antiserum C). Bahn 1: Nicht-induzierte Bakterien-Kultur; 2: Bakterienkultur induziert; 3: Lösliche Fraktion; 4: 1 M Harnstoff-Fraktion; 5: 7 M Harnstoff-Fraktion nach dem Binden an die Ni²⁺-NTA-Affinitätsmatrix; 6: Wasch-Fraktion der Affinitätsmatrix nach dem Binden; 7: Protein-Eluat; 8: Marker. Die Angaben der Fraktionsbezeichnungen beziehen sich auf die entsprechenden Bezeichnungen in den Methoden. Die entsprechenden Waschfraktionen wurden nicht standardmäßig untersucht. In diesem Fall wurde das etwa 30 kDa Zielprotein, p30, in guter Menge und Reinheit erhalten.



Überraschenderweise zeigte sich, dass alle Zielproteine mit His₆-„tag“ in der 7 M Harnstoff-Fraktion gefunden wurden und damit als unlösliche

Polypeptide in den Bakterien vorlagen. Insgesamt waren die Proteine für die Seren A, C, F, H, I und L über das pQE-System gut zugänglich. Die übrigen Konstrukte zeigten nach einem analytischen PAGE-Gel nach Induktion keine zusätzlich oder verstärkte Bande, so dass angenommen werden musste, dass die entsprechenden Proteine nicht (nennenswert) exprimiert worden waren. Daher erfolgte für die Proteine, mit denen die Seren E, G, J, und K gewonnen wurden der Wechsel auf das pEx-System. Da von vorneherein mit weniger Protein gerechnet

wurde, erfolgte die Kontrolle der Induktion und Reinigung immer über Western-Blots. Obwohl alle Proteine in den Bakterien quasi ungelöst vorkamen (in der 7 M Harnstoff-Fraktion, also wahrscheinlich als „inclusion bodies“) und so auch toxische Proteine besser exprimierbar sein sollten, waren auch hier die Ausbeuten z. T. sehr gering. Dies ging soweit, dass für die Proteine der Seren B1, B2 und D1 für jede Immunisierung das Produkt aus der Reinigung von 400 ml Bakterien-Kultur benötigt wurde.

Die Reinigung der Fusionsproteine aus dem pEx-System erfolgte aus *E. coli* Nm537. Durch den sehr großen Fusionsanteil mit 99 Aminosäureresten entstanden bei den entsprechenden Immunisierungen dann auch immer Antikörper gegen die MS-2-Polymerase. Dies ist aber nicht störend, da das entsprechende Enzym in eukaryontischen Zellen nicht vorkommt und auch keine Kreuzreaktivität mit FCV-Proteinen zu erwarten war. Beim pEx-System erfolgte als letzter Reinigungsschritt ein präparatives PAGE-Gel, aus dem nach Coomassie-Färbung die Zielbande ausgeschnitten wurde. Da hier immer der Farbstoff gebunden blieb, erfolgte die Abschätzung der Proteinmenge in analytischen PAGE-Gelen im Vergleich zu einem Lysozym-Standard. Um die Identität des Proteins zu verifizieren, wurden routinemäßig die Eluate im Western-Blot mit Anti-MS-2-Polymerase-Seren überprüft.

Die Immunisierung der Kaninchen mit den so gewonnenen Proteinen und die Erzeugung der Seren übernahm im Rahmen einer Kooperation freundlicherweise Dr. H. Schirrmeier (BFAV, Insel Riems).

Mit diesen beiden Expressionssystemen wurden schließlich Antiseren für die ersten 9 Proteine der Tabelle 3 (Antiseren A-L für „p16“ bis „VP10“) gewonnen. Als funktioneller Test diente dann der spezifische Nachweis von FCV-Proteinen in infizierten CRFK-Zellen. Die Proteine für „p23“, „p23-hinten“ und „Übergang“ konnten isoliert werden. Die entsprechenden Immunisierungen wurden begonnen, haben aber bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht zu Antiseren geführt, die spezifisch FCV-Proteine in infizierten Zellen erkennen.

3.3.3 Nachweis einzelner FCV-Polyproteinprozessierungsprodukte

Mit den erzeugten Anti-FCV-Seren konnten einige Befunde aus der Literatur bestätigt werden und die entsprechenden Proteine in infizierten CRFK-Zellen nachgewiesen werden. Die entsprechenden Daten wurden in der Abbildung 20 zusammengefasst. In diesen Versuchen wurde das Translationsprodukt des ORF3, das VP10, als ein Protein von etwa 9 kDa mit dem Antiserum L nachgewiesen. Dies korreliert gut mit der Literaturangabe von 8,5 kDa (Sosnovtsev und Green, 2000)

Auch das Antiserum K gegen das Hauptkapsidprotein erfüllte seinen Zweck und detektierte ein Protein von ungefähr 60 kDa. Dies ist konsistent mit der Literatur (Sosnovtsev et al., 1998) und wurde auch durch ein polyklonales Anti-FCV-Serum bestätigt, das durch Immunisierung mit FCV-Virionen erhalten worden war (bereitgestellt von Prof. M. Büttner, Daten nicht gezeigt). Diese Bande trat auch regelmäßig, allerdings deutlich schwächer bei den übrigen Präzipitationen aus infizierten Zellen auf. Ursache war die unspezifische Präzipitation des Kapsidproteins möglicherweise als Folge von spontaner Aggregation des Proteins, die zur Bildung von leeren Viruskapsiden, sog. „virus like particles“ VLPs, führte. Ebenso wurde das zweite Produkt des ORF2-Polypeptids, das vordere Spaltstück von 124-Aminosäuren („Leader“), mit etwa 12 kDa in infizierten Zellen mit dem Antiserum J nachgewiesen. Ein gemeinsamer Vorläufer dieser beiden Proteine war mit keinem der beiden Seren zu beobachten.

Das VPg wurde mit dem Antiserum G identifiziert und es entsprach in seiner Größe der Erwartung nach der Literatur mit ca. 13 kDa (Sosnovtsev und Green, 2000). Ähnlich wie beim RHDV wurde in den infizierten Zellen das VPg als Doppelbande nachgewiesen, was vermutlich auf posttranslationale Uridinylierung zurückzuführen ist. Das Antiserum G präzipitierte zusätzlich ein Protein von ca. 41 kDa.

Auch die Antiseren H und I, die für die Detektion der Protease und der Polymerase bestimmt waren, lieferten spezifische Banden. Dabei zeigten sich prinzipielle Unterschiede zum RHDV. Wohl war mit beiden Seren der wahrscheinliche gemeinsame Vorläufer mit ca. 70 kDa zu erkennen, doch ergab das Bandenmuster ein quasi identisches Bild, bei dem neben diesem etwa 70 kDa großen Protein keine kleineren spezifischen Banden zu erkennen waren. Das Ergebnis deutet darauf hin, dass keine Spaltung zwischen Protease und Polymerase stattgefunden hatte.

Die übrigen Seren ergaben ebenfalls spezifische Signale, deren Interpretation zur Zeit aber noch nicht abschließend möglich ist. Dies liegt zum Teil an den fehlenden Seren, womit eine eindeutige Zuordnung der Proteinbanden zu bestimmten ORF1-Abschnitten nicht möglich war und daran, dass weitergehende Experimente (Ko- oder Vor-Präzipitationen für die sich überlappenden Bereiche) bislang nicht durchgeführt wurden. Es lässt sich aber sagen, dass mit dem 5'-terminalen Antiserum A („p16“) eine Bande von etwa 30 kDa präzipitiert werden konnte (Abb. 19), bei der bisher nicht entschieden werden kann, ob sie das N-terminale Prozessierungsprodukt des ORF1 darstellt oder ob vor diesem Polypeptid noch ein kleineres Protein lokalisiert ist, das bisher nicht nachgewiesen wurde. Auch das Antiserum C, das mit einem Protein gewonnen wurde, das voraussichtlich den Bereich der Helikase (2C-like) abdeckt, ergab ein spezifisches Signal. Diese Proteinbande mit etwa 37 kDa hat praktisch die-

selbe Größe, wie das entsprechend lokalisierte Polypeptid bei RHDV, für das die Helikase-Funktion gesichert ist. Da hier noch das Serum gegen das aminoterminal direkt anschließende Fragment des Polyproteins fehlt, ist auch hier die genaue Lokalisation in Bezug zum FCV-Genom nicht möglich und die Funktionszuweisung „2C-like“ wurde in der Abbildung 21 (s. u.) mit einem Fragezeichen versehen.

Der Bereich, der bei RHDV zu p41 führt, wird durch bislang 3 Antiseren (E, F und G) abgedeckt. Das Antiserum G gegen das VPg erkannte das VPg, dessen Lokalisation bereits bekannt war (Clarke und Lambden, 1997). Zudem wurde ein Protein mit ca. 40 kDa präzipitiert. Da auch hier, wie beim Antiserum C, ähnliche Banden auftraten wie bei RHDV, ist wohl die Annahme einer vergleichbaren Struktur möglich. Damit wäre das 41-kDa-Protein das Homologe zu RHDV-p41. Dazu passt, dass ein Protein dieser Größe auch mit den Antiseren E und F (vgl. Tab. 3) detektiert wurde, aber nicht mit dem Serum C. Ähnliches gilt für eine Bande von etwa 28 kDa, die ebenfalls mit den Antiseren E und F ordentlich nachweisbar war und mit dem Serum G gerade noch erkennbar war. Da das VPg bekannt war, musste die letzte Beobachtung allerdings auf eine Kopräzipitation oder auf eine Spaltung im Verlauf des Experiments zurückzuführen sein.

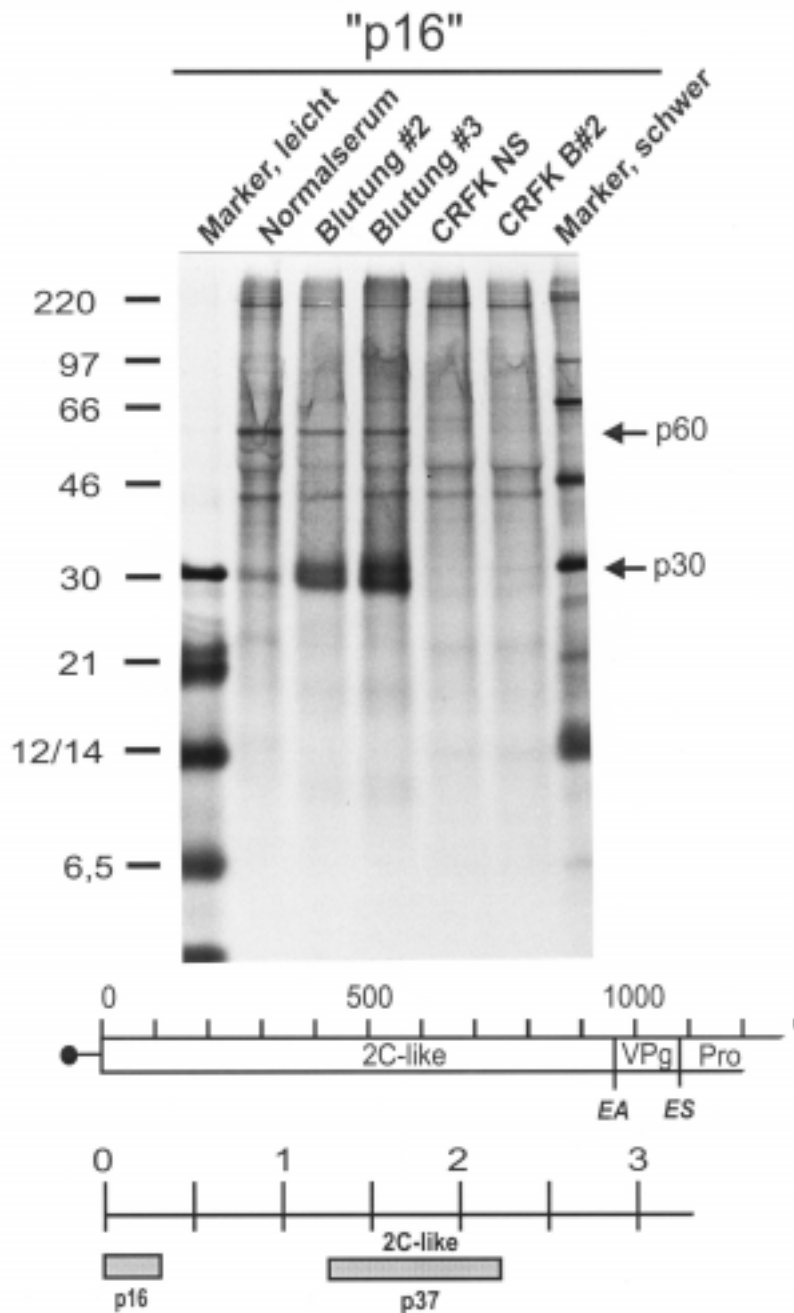


Abb. 19: Nachweis eines Expressionsproduktes von wt-FCV mit dem Serum A oder „p16“ nach radioaktiver Markierung. Der Aufbau der Abbildung entspricht dem bei RHDV: Unter dem Kopf mit der Bezeichnung des Antiserums „p16“ folgt die Darstellung der Radioimmunpräzipitation nach PAGE. Am linken Rand die Angabe der Größenstandards in kDa. Die entsprechenden Bahnen des Gels sind randständig (Marker, leicht und Marker, schwer; Spuren 1 und 7); die 2. Spur stellt die Reaktion von Präimmuserum (Normalserum, NS) mit FCV-infizierten CRFK-Zellen dar. Die 3. und 4. Spur zeigen die Reaktion des Antiserums mit FCV-infizierten CRFK-Zellen nach der 2. bzw. 3. Blutung. Spur 5 und 6 zeigen die Reaktion des Normalserums bzw. des Antiserums nach der 2. Blutung mit CRFK-Zellen. Der Bereich, aus dem das Protein zur Immunisierung für das „p16“-Antiserum A gewonnen wurde, ist als Balken unter dem Nukleotid-Maßstab bzgl. des FCV-Genoms dargestellt.

Man erkennt, dass das Antiserum A oder „p16“ ein Protein von ca. 30 kDa spezifisch präzipitierte. Dies ist aber das einzige spezifische Signal.

Die weiteren spezifischen Seren werden in kürzerer Form dargestellt. Es werden jeweils nur die Produkte der Präzipitation mit dem jeweiligen Serum aus nichtinfizierten und FCV-infizierten CRFK-Zellen gegenüber gestellt. Die Reaktionen von Normalserum mit CRFK-Zellen mit oder ohne FCV-Infektion werden nicht gezeigt, da sich daraus keine weiteren Informationen ergeben.

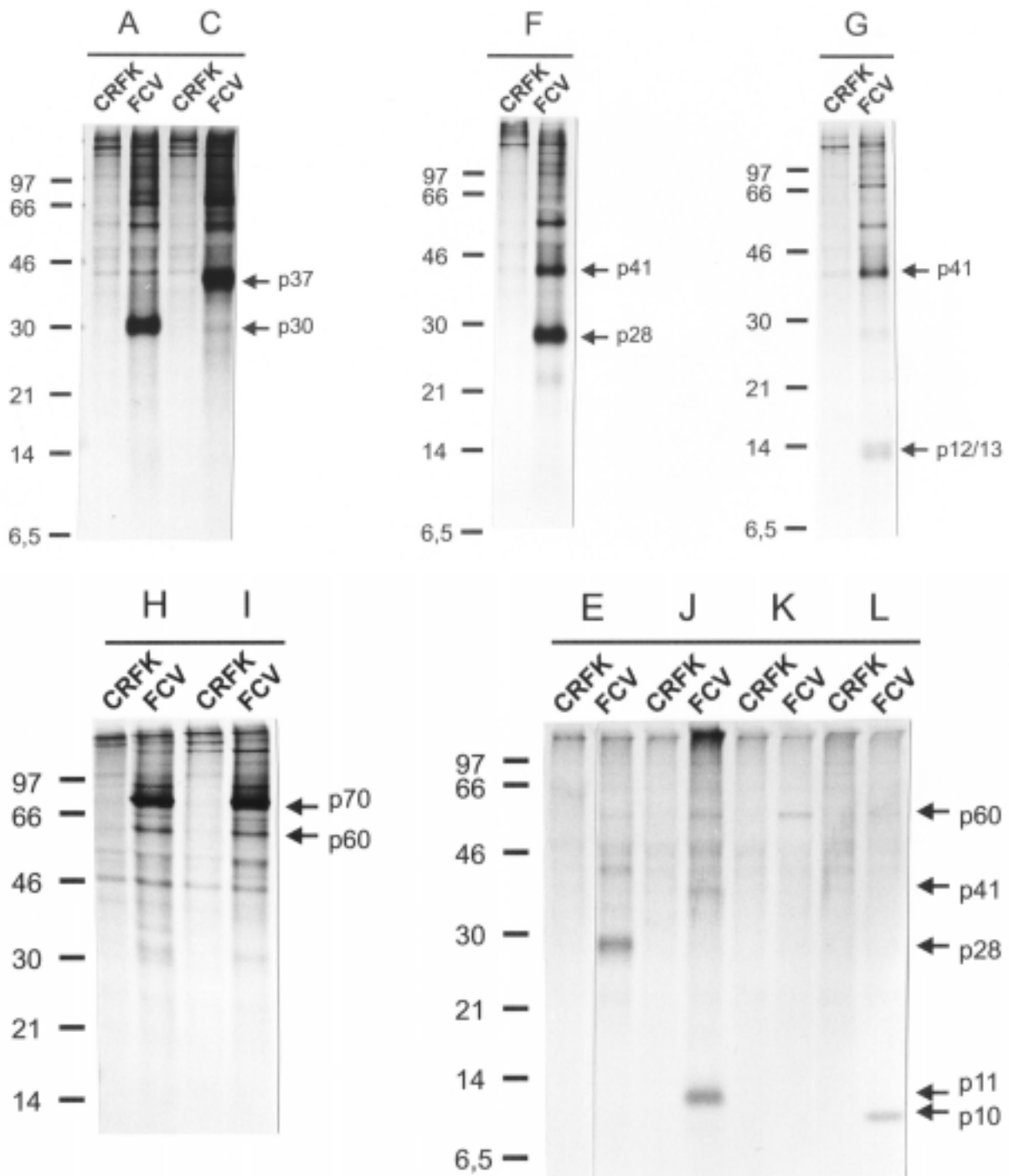


Abb. 20: Nachweis verschiedener spezifischer FCV-Proteine mit polyklonalen Antiseren. Zur Lokalisation der Proteine in Bezug zum FCV-ORF1-Polyprotein oder den Produkten von ORF2 und ORF3 vgl. Tabelle 3 und Abbildung 21.

Den aktuellen Stand zur Genomorganisation des FCV fasst die nachfolgende Abbildung 21 zusammen, auf der für das FCV eine Nukleotid- und eine Aminosäurereste Skala den Kopf bilden. Darunter ist die bekannte Anordnung der 3 ORFs mit den gesicherten Proteasespaltstellen aufgeführt. Die vermuteten und bekannten Proteinfunktionen stehen in den Balken. Den mittleren Block bilden die Darstellungen der Bereiche, mit denen die Antiseren A bis L gewonnen wurden. Die schraffierten Balken B1, B2 und D1 repräsentieren diejenigen Seren, die noch nicht spezifisch reagierten. Der untere Block mit den dunkelgrauen Balken zeigt die mit den Antiseren präzipitierten Proteine, wiederum mit Angabe der vermuteten Funktion und der beobachteten Größe in kDa.

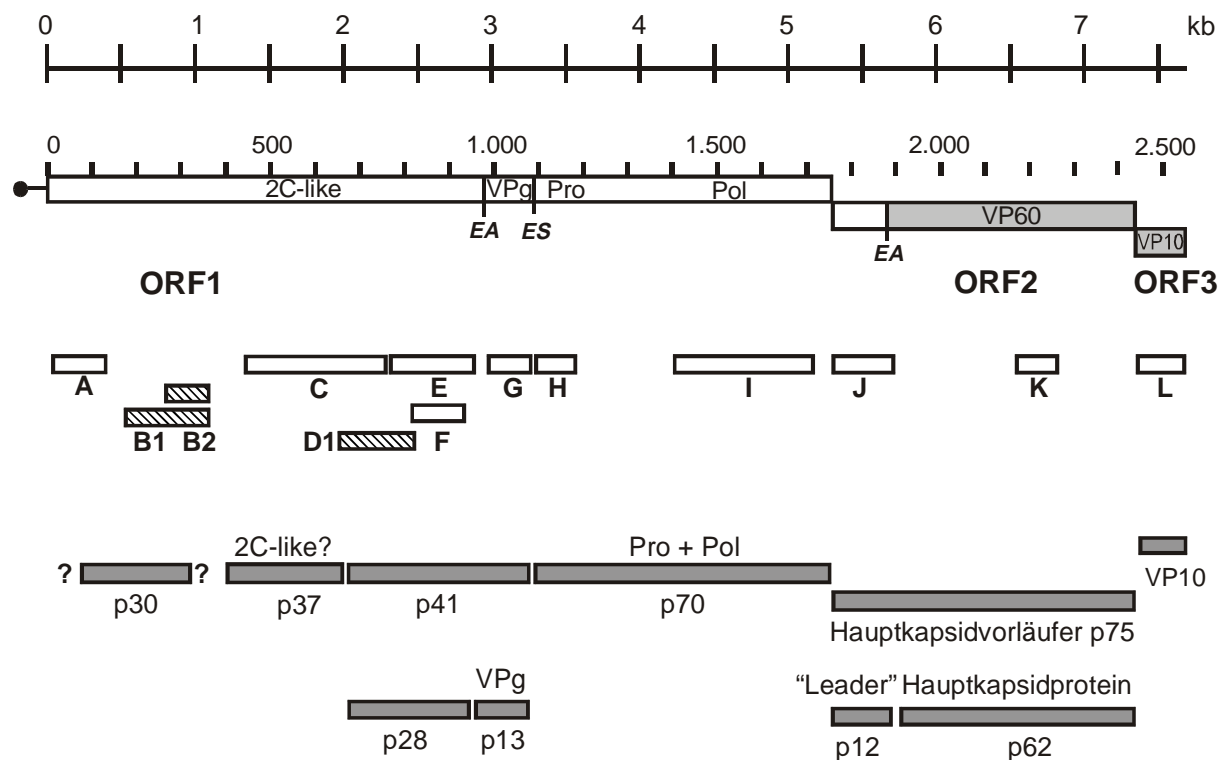


Abb. 21: Vorschlag zur Genomorganisation von FCV.

Ganz oben ist als Maßstab die Anzahl der Nukleotide in kb angegeben, die zweite Reihe bildet ein Maßstab in Aminosäureresten. Darunter folgt die bekannte Gliederung des FCV-Genoms in 3 ORFs, die als Balken dargestellt sind. Verschiebungen entsprechen den Rasterwechseln. Für die drei bekannten Proteaseschnittstellen sind die P1/P1'-Reste im 1-Buchstaben-Kode dargestellt und die charakterisierten oder vermuteten Funktionen von Proteinen sind in die Balken eingetragen. Hier stehen die hellgrauen Teile für Strukturproteine. Der mittlere Block symbolisiert die Lokalisation der FCV-Antiseren (vgl. Tab. 3). Schraffiert sind diejenigen Fusionsproteine, mit denen bislang keine spezifischen Antiseren erhalten wurden. In den unteren beiden Reihen sind die mit den FCV-Antiseren nachgewiesenen Proteine als graue Balken dargestellt. Die Zahlen geben die abgeschätzten Größen nach denaturierender PAGE wieder, Pro-Pol repräsentiert das Produkt mit Polymerase und Protease-Aktivität. Die Fragezeichen symbolisieren die unklare Lokalisation des p30. Vor oder nach diesem können noch weitere Proteine existieren. Das Fragezeichen bei 2C-like soll andeuten, dass die Korrelation mit dieser Funktion für dieses Protein nahe liegt, aber noch nicht bewiesen ist. Die unterste Reihe zeigt kleinere Prozessierungsprodukte, die formal aus den darüber stehenden Polyproteinprodukten entstehen.

Damit stellt sich der Stand so dar, dass die Methode im Prinzip validiert wurde und die vorhandenen Antiseren ihren Wert durch Abgleich mit publizierten Daten bewiesen haben bzw. neue Ergebnisse im Vergleich mit dem RHDV zumindest plausibel sind.

4 Diskussion

4.1 Rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV)

Alle Untersuchungen zur Replikation oder zur Polyproteinprozessierung von RHDV werden durch das Fehlen eines Gewebekultursystems zur Vermehrung des Virus erheblich behindert. Mit verschiedenen Ansätzen wurde versucht, dieses Problem zu umgehen. So wurden Proteinexpression in Bakterien, *in vitro* Translation viraler RNA und die Infektion primärer Hepatocyten aus Kaninchen zur Darstellung von RHDV-Proteinen verwendet (Boniotti et al., 1994; Alonso et al., 1996; Wirblich et al., 1996; König et al., 1998). Basierend auf diesen Methoden konnten virale Proteine nachgewiesen werden und eine weitgehend vollständige Karte des RHDV-Genoms erstellt werden (Wirblich, 1995; König et al., 1998). Allerdings haben alle verwendeten Methoden entscheidende Nachteile. Das aussagekräftigste System ist die Infektion isolierter primärer Hepatocyten. Diese Technik ist aber schwierig und aufwendig in der Handhabung, da die Zellen bereits wenige Stunden nach der Präparation nicht mehr infizierbar sind und daher für den Routine-Einsatz als Test- und Analysesystem wenig geeignet sind. Darüber hinaus ist die Untersuchung definierter Virus-Mutanten nicht möglich, da bislang kein „infektiöser Klon“ für RHDV existiert. Aus diesen Gründen wurde für die Untersuchungen zur Proteinexpression von RHDV ein transientes System etabliert, das auf der Transfektion von DNA-Konstrukten und der Expression der transfizierten Sequenzen mittels Vaccinia-Virus kodierter T7-RNA-Polymerase basiert (Meyers et al., 2000).

Die damit erzielten Ergebnisse sind konsistent mit den Daten aus den Hepatocyten-Versuchen. Einige wenige Proteine, die in den Hepatocyten gezeigt werden konnten, waren aber nach transientscher Expression nicht nachweisbar. Die Proteine p26, p65 und p14 aus den Hepatocyten entsprechen dabei wahrscheinlich Varianten der beschriebenen Proteine p23, p60 und p13 (VPg). Eine mögliche Ursache für diese Unterschiede ist das Auftreten von co- oder posttranslationalen Modifikationen der Proteine in Hepatocyten (König et al., 1998), z. B. kann das p14 ein p13 mit einem oder mehreren angehängten Nukleotiden darstellen, wie es für das Picornavirus-VPg mit VPg-pU / VPg-pU-pU beschrieben ist (Porter 1993). Diese Modifikation könnte davon abhängig sein, dass Virus-Replikation stattfindet und daher im transienten Expressionssystem, in dem vermutlich keine RHDV-Replikation stattfindet, ausblei-

ben. Alternativ könnte die Ursache auch einfach ein anderer Weg der posttranslationalen Modifikation zwischen Kaninchen-Hepatocyten und BHK-21-Zellen sein.

Ein gravierender Unterschied zwischen den mit den Hepatocyten erzielten Ergebnissen und der transienten Expression in BHK-Zellen ergab sich allerdings in Bezug auf die Prozessierung der p41-Region des Polyproteins. In den Hepatocyten-Experimenten (König et al., 1998) konnten die Proteine p29, p23/2 und p13/p14 nachgewiesen werden. Dabei wurde auch klar, dass p23/2 kolinear zu p29 ist. Unklar blieb hingegen, ob p23/2 den C- oder den N-Terminus oder ein internes Fragment von p29 darstellt. Auch das zusätzliche (die zusätzlichen) Spaltprodukt(e) konnten nicht gezeigt werden. Nach der transienten Expression konnte dagegen zusätzlich zu p13, p29 und p23/2 ein weiteres Protein mit ca. 18 kDa - p18 - dargestellt werden. Aufgrund der Größe und des Reaktionsmusters mit den Antiseren sollte p18 aus p13 und den carboxyterminalen 5 kDa von p29 bestehen. Daraus ergibt sich, dass das p41 entweder in p23/2 und p18 oder p29 und p13 gespalten werden kann (Abb. 22). Dementsprechend stellt p23/2 den aminoterminalen Abschnitt von p29 dar.

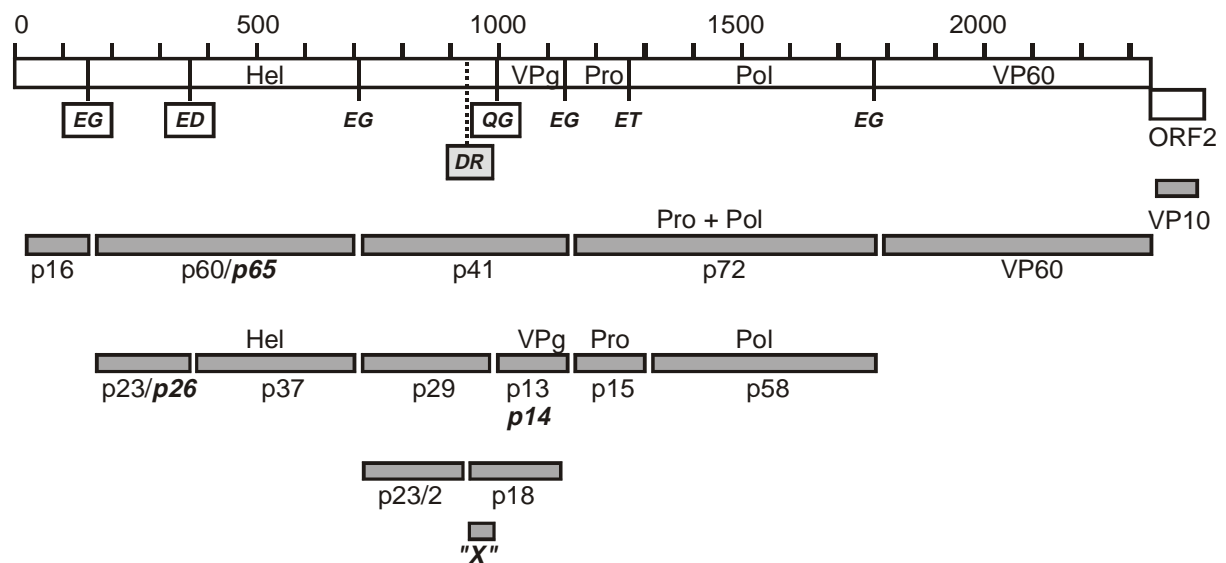


Abb. 22: Schematische Darstellung der von RHDV kodierten Proteine und der identifizierten Protease-Spaltstellen. Der obere Balken zeigt die hypothetischen Translationsprodukte des ORF1 und des ORF2. Aufgesetzt ist eine Skala in Aminosäureresten. Regionen mit bereits in ihrer Funktion bekannten viralen Proteinen sind markiert. Vertikale Balken kennzeichnen die Protease-Schnittstellen und die gespaltenen Dipeptide sind im 1-Buchstaben-Code angegeben, in Rahmen stehen die während dieser Arbeit identifizierten Spaltstellen. Die Position der als letztes bestimmten Prozessierungsstelle ist hervorgehoben angegeben (DR). Darunter folgt die Darstellung des VP10 und der Prozessierungsprodukte des ORF1-Polyproteins. Fett bezeichnet sind Proteine, die nur in Experimenten mit Hepatocyten gezeigt werden konnten, aber nicht nach *in vitro* Translation oder transienter Expression. „X“ steht für das 5-kDa-Protein (p5), dessen Existenz man annehmen kann, das aber bisher noch nicht nachgewiesen werden konnte.

Im Lichte dieser Ergebnisse ergab eine nochmalige Analyse der Gele mit Protein aus infizierten primären Hepatocyten, dass das p18 auch sichtbar war, allerdings nur schwach und daher für ein Nebenprodukt oder Artefakt gehalten worden war. In den infizierten Hepatocyten war also die Spaltung in p29 und p13 bevorzugt oder p18 wurde sehr rasch weiterprozessiert und war dann kaum noch nachzuweisen. Das zu erwartende Spaltprodukt mit ca. 5 kDa war allerdings, trotz verschiedener experimenteller Ansätze, bis jetzt nicht nachzuweisen.

Das Genom der Caliciviren kodiert für eine proteolytische Aktivität, die für die meisten Prozessierungsschritte des Polyproteins verantwortlich ist. Der funktionelle Nachweis dieser Protease wurde zuerst für das RHDV erbracht (Boniotti et al., 1994; Wirblich et al., 1995; Alonso et al., 1996). Sequenz- und Mutationsanalysen erlaubten es, diese Protease einer Gruppe von Cystein-Proteasen mit strukturellen Ähnlichkeiten zur Gruppe der Chymotrypsin-ähnlichen Proteasen zuzuordnen (Boniotti et al., 1994). Prototyp dieser Proteasen ist die 3C-Protease der Picornaviren. Die Protease der Caliciviren entspricht dieser sowohl in Bezug auf die Lokalisation im Polyprotein als auch in den Hauptfunktionen. Im ORF1-Polyprotein von RHDV waren mehrere von der 3C-ähnlichen Protease gespaltene Sequenzen identifiziert und bezüglich der Anforderungen der Protease an diese Schnittstellen weiter untersucht worden (Wirblich 1995; Wirblich et al., 1995, Alonso et al., 1996). Ausgehend von diesen Ergebnissen und den Untersuchungen zur Organisation des ORF1-Polyproteins wurden mittels Mutationsanalysen die übrigen vier Spaltstellen im Polyprotein identifiziert (Abb. 22). Prinzipiell kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, dass die eigentlichen Spaltstellen an anderen Positionen liegen und konformationelle Änderungen durch die eingeführten Mutationen die Spaltung durch die virale Protease bzw. die unbekannte proteolytische Aktivität, die den Aminoterminus von p5/p18 generiert, verhindern. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da zum einen die Spaltstellen die bekannten Sequenzvoraussetzungen für die virale Protease erfüllen, während solche Sequenzen in der Nachbarschaft nicht mehr zu finden sind. Zum anderen unterbanden die eingeführten Mutationen an der jeweiligen Position die Spaltung effizient, bewirkten aber in der Regel keine unspezifischen Nebeneffekte an benachbarten Schnittstellen. Darüber hinaus ergab bei mehreren Mutationen in einem engen Bereich nur jeweils eine das entsprechende Ergebnis mit Blockierung einer Spaltstelle. Auch die Untersuchung der bereits bekannten Schnittstellen mit entsprechenden durch Mutagenese erzeugten Aminosäureaustauschen stützt die erzielten Ergebnisse.

Man darf daher annehmen, dass die identifizierten Sequenzen tatsächlich die Spaltstellen für die virale Protease darstellen. Mit diesen vier neuen und den bereits vorher bekannten vier Spaltstellen sind damit alle 8 erwarteten Prozessierungsorte im ORF1-Polyprotein des RHDV

aufgeklärt. Die ermittelten Spaltstellen sind auch konsistent mit der genetischen Karte, die aus verschiedenen Präzipitationsexperimenten abgeleitet wurde. Betrachtet man die die Spaltstellen flankierenden Aminosäuren, so ist zu konstatieren, dass diese in 7 Fällen den Anforderungen der viralen Protease genügen. Daher ist davon auszugehen, dass das virale Enzym für diese 7 Spaltungen verantwortlich ist.

Die beiden die jeweilige Spaltstelle flankierenden Reste sind bis auf eine Ausnahme komplett konserviert in allen bekannten RHDV-Sequenzen, lediglich ein italienisches Isolat zeigt am p37/p41-Übergang ein DG- statt des üblichen EG-Dipeptids. Auch in der Sequenz des EBHSV, eines anderen Calicivirus aus dem Genus Lagovirus, das ein Pathogen für Hasen ist, sind die Aminosäuren an den entsprechenden Positionen konserviert: Eine Ausnahme bildet die ET-Spaltstelle zwischen Protease und Polymerase, denn die von Le Gall et al., 1996, publizierte EBHSV-Sequenz weist an dieser Position das Dipeptid EN auf. Aufgrund der konservierten Spaltstellen ist davon auszugehen, dass die Genomorganisation und Polyproteinprozessierung bei allen Mitgliedern des Genus Lagovirus der Familie Caliciviridae sehr ähnlich ist.

Nochmals eingegangen werden muss auf die Spaltstelle am N-Terminus von p5/p18. Durch die Lokalisation des p5 wurde der Bereich, der für die Prozessierungsschnittstelle in Frage kommt, deutlich eingengt. So war es möglich durch eine begrenzte Anzahl in enger Nachbarschaft liegende Mutationen den fraglichen Bereich komplett abzudecken. Damit gelang es auch, die letzte Spaltstelle zu identifizieren. Nach diesen Daten erfolgt die Spaltung zwischen den Aminosäuren 936 und 937 des ORF1-Polyproteins, d. h. zwischen Asparaginsäure und Arginin. Aufgrund dieser für die RHDV-Polymerase ungewöhnlichen Spaltstelle wurde ein Test durchgeführt, der zeigen sollte, ob diese Spaltung von der viralen 3C-ähnlichen Protease ausgeführt wird. Als Ergebnis zeigte sich, dass diese in BHK-Zellen beobachtete Prozessierung nicht durch die virale 3C-ähnliche Protease erfolgt. Möglich ist, dass die Prozessierung durch Protease-Aktivität eines anderen viralen Proteins durchgeführt wird. Dies kann entweder eine Protease im üblichen Sinne sein oder eine Protease, die nur sich selber spaltet bzw. deren weitere Substrate unbekannt sind, oder es könnte eine labile Sequenz sein, bei der eine durch die Faltung energiereiche Bindung spontan hydrolysiert wird. Entsprechende Fälle sind bei verschiedenen Viren bereits nachgewiesen worden (Porter, 1993; Rümenapf et al., 1998; Hahn und Palmenberg, 2001). Der Weg, über den die Prozessierung am N-Terminus von p5/p18 erfolgt, mag noch unklar sein, aber die Position der Spaltstelle darf als gesichert gelten. Damit war die letzte noch nicht charakterisierte Prozessierungsstelle im ORF1-Polypeptid identifiziert.

Auch beim humanen Southhampton Virus (SV), einem Mitglied des Genus „Norwalk-like Virus“, wurde die ORF1-Polyproteinprozessierung bereits untersucht. Auch hier wurden cDNA-Fragmente in Bakterien exprimiert, und es wurden zudem *in vitro* Translationsstudien mit RNA, die aus einem cDNA-Konstrukt abgeleitet war, durchgeführt (Liu et al., 1996, 1999). Dabei wurden Spaltprodukte mit 48, 41 und 113 kDa beobachtet, deren Abfolge entsprechend vom N- zum C-Terminus war. Mit Expressionsversuchen in Bakterien konnte gezeigt werden, dass das p113 weiter gespalten wird in Proteine mit 22, 16 und 57 kDa. Das Spaltprodukt p48 entspricht dann formal der p16/p23-Region bei RHDV und das p41 (SV) dem p37 (RHDV). Die 22-kDa-Bande ist vor dem VPg (p16) lokalisiert und entspräche dem p29 (RHDV); es ist nicht klar, ob das p22 nochmals gespalten wird und so Entsprechungen zum RHDV-p23/2 und zum hypothetischen p5 entstünden. Das VPg ist etwas größer als das RHDV-VPg (16 zu 13 kDa). Auch die SV-Protease ist mit ca. 19 kDa etwas größer als das RHDV-Homolge (14 kDa). Die Polymerasen sind annähernd gleich groß (57 und 58 kDa). Alle 5 Spaltstellen wurden durch Proteinsequenzierung identifiziert und es handelt sich um QG, EA oder EG-Dipeptide. Die Spezifitäten der beiden Proteasen von SV und RHDV scheinen also sehr ähnlich zu sein. Dafür scheint aber ein deutlich anderes Prozessierungsmuster mit nur 5 Spaltstellen bei SV im Gegensatz zu den 8 bei RHDV vorzuliegen. Interessant wird sein, ob die Analyse der SV-Expression in eukaryontischen Zellen – falls dies experimentell möglich wird – diesen Unterschied bestätigt.

Beim Primaten-Calicivirus Pan-1 wurde das VPg nach Reinigung des RNA-gebundenen Proteins untersucht (Dunham et al., 1998). Auch in diesem Fall handelt es sich um ein Protein von ca. 16 kDa, dessen Lokalisation im Polyprotein nach den Daten einer Proteinsequenzierung bestimmt wurde und dessen kodierende Sequenz in demselben Bereich des Genoms liegt, der für die bisher untersuchten VPgs ermittelt wurde.

Die Polyproteinprozessierung in Plus-Strang RNA Viren ist ein hochgradig geordneter Prozess, aus dem die Produkte in definierten Mengenverhältnissen hervorgehen. Zusätzlich unterliegen diese Mengenverhältnisse, deren Einhaltung für das Virus funktionell wichtig ist, der Veränderung während des Replikationszyklus des Virus. Eine Möglichkeit dies zu erreichen stellt die kinetische Kontrolle einzelner Spaltungen dar, wie sie für verschiedene Picornaviren beschrieben wurde (Kuhn und Wimmer 1987). P1, P2 und P3 stellen die ersten Prozessierungsprodukte dar, während ein vollständiges Polyprotein quasi nicht festzustellen ist (Palmenberg 1987). Bei den Versuchen zur transienten Expression des RHDV-Polyproteins konnte in keinem Fall eindeutig das komplette ORF1-Polyprotein oder ein ähnlich großer Vorläufer beobachtet werden. Augenscheinlich wird ein Gleichgewicht zwischen den Haupt-

prozessierungsprodukten p16, p23, p37, p41, p58, p72 und VP60 in weniger als 10 Minuten erreicht. Daher scheint die Spaltung an den entsprechenden Spaltstellen mit sehr ähnlichen Raten zu erfolgen. Möglicherweise würde sich das in infizierten Zellen anders darstellen, doch auch dann handelte es sich nicht um eine intrinsische Eigenschaft der jeweiligen Spaltstelle. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Spaltungen innerhalb des p41 gegenüber den oben genannten Spaltungen verzögert sind. Sowohl zur weiteren Untersuchung dieses Effektes als auch zur Frage nach den Vorläufer/Produkt-Beziehungen bei p60 und p23/p37 bzw. p72 und p15/p58 könnten in der Zukunft „pulse-chase“-Experimente nützlich sein.

Ein weiteres interessantes Ergebnis der kinetischen Untersuchungen betrifft das erste Protein, das der ORF1 kodiert. Die Menge an p16 erreicht nach etwa 1 h ein Maximum und fällt dann wieder ab. Dies erklärt wohl die Schwierigkeiten, die früher bei der Markierung nach dem Standardprotokoll beim Nachweis dieses Proteins auftraten. Bei der Analyse nach Infektion von Hepatocyten wurde spekuliert, dass diese Probleme auf die Instabilität des Proteins zurückführbar sein könnten (König et al., 1998). Allerdings würde man im verwendeten Analysesystem dann eher erwarten, dass die Menge an p16 ein niedriges, aber konstantes Plateau erreicht. Dagegen wurde hier klar gezeigt, dass die Proteinmenge wieder abnimmt. Auch die Aufklärung der Ursachen dieses Effektes stellt eine interessante Aufgabe für zukünftige Arbeiten dar.

Außer über die Kinetik können auch durch eine hierarchische Organisation, bei der eine (effiziente) Spaltung an der Position Y erst möglich wird, nachdem an der Position X gespalten wurde, die notwendigen Konzentrationsverhältnisse der verschiedenen Spaltprodukte eingestellt werden. Solche Hierarchie-Modelle sollten sich mit Mutanten, bei denen je eine Spaltstelle blockiert ist, entdecken lassen. Die Untersuchungen bei RHDV haben Hinweise auf einen solchen Einfluss der Blockierung einer Spaltstelle auf benachbarte Spaltungen für zwei Positionen ergeben. Zuerst konnte dies für die Spaltung zwischen p16 und p23 nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich, dass durch die Blockierung dieser Spaltung auch der Übergang p23-p37 nicht mehr effizient gespalten wurde, was am Auftreten des fp75 abzulesen war. Da ein solches 75-kDa-Protein im Wildtyp zuvor bei keinem Experiment nachgewiesen werden konnte, spricht dies dafür, dass im Normalfall eine rasche und vollständige Spaltung zwischen p16 und p23 stattfindet. Die beobachtete Blockade war aber nicht komplett, da immer noch p37 deutlich nachweisbar war. Auch hier muss in weiteren Versuchen über „pulse-chase“-Experimente geklärt werden, ob fp75 in p37 und ein „fp40“ aus p16 + p23 gespalten wird, oder ob es sich beim fp75 tatsächlich um ein Endprodukt handelt.

Die zweite Position, bei der ein Einfluss auf andere Spaltstellen entdeckt wurde, ist die Spaltung am N-Terminus des p41. Dies entspricht formal dem P2-P3-Übergang bei den Picornaviren. Bei den Untersuchungen mit den wt-RHDV-Klonen war nie ein p37-p41-Fusionsprotein zu beobachten. Dies gilt sogar für die Analysen der *in vitro* Translation der RNA, einer Methodik, die üblicherweise zu einer sehr unvollständigen Prozessierung des ORF1-Polyproteins führt (Wirblich et al., 1996). Bei der Wildtyp-Sequenz erfolgt also die Prozessierung an dieser Position sehr rasch und vollständig. Bei Blockierung dieser Spaltstelle unterblieb jedoch die Prozessierung im p41 an zwei weiteren Dipeptiden so weit, dass die Prozessierungsprodukte nicht mehr nachweisbar waren. So bewirkte die Blockierung der p37-p41-Spaltstelle nicht nur die Verhinderung einer Prozessierung der nächsten benachbarten Spaltstelle, sondern auch die übernächste Spaltstelle wurde nicht mehr prozessiert. Blockierung der Spaltung zwischen P2 und P3 bei Picornaviren führte dagegen nicht zu ähnlichen Ergebnissen. Für das Poliovirus (PV) wurde mit einer Mutante, bei der die Spaltung zwischen 2C und 3A verhindert war, gezeigt, dass die Proteine 2A, 2B und 3CD bei *in vitro* Translation im normalen Verhältnis gebildet wurden (Cohen et al., 1996). Leider blieb unklar, ob bei diesem Versuch die Spaltung zwischen 3A und 3B beeinflusst wurde. Ein ähnliches Ergebnis erbrachte ein Experiment, bei dem in das Genom des Enzephalomyokarditis Virus eine vergleichbare Mutation eingeführt wurde (Hall und Palmenberg, 1996). Gesichert ist allerdings für diese beiden Ansätze, dass es keinen Einfluss auf übernächste oder weiter entfernt liegende Spaltstellen gab, der mit dem Effekt bei RHDV vergleichbar wäre. Auch Mutationen an anderen Prozessierungsstellen im P2 oder P3 haben keinerlei Hinweise auf irgendeine hierarchische Organisation ergeben (Cohen et al., 1996; Hall und Palmenberg, 1996).

A priori war nicht auszuschließen, dass eine hierarchische Organisation auch echte Fernwirkungen verursacht und weit entfernte Spaltstellen im ORF1-Polyprotein von RHDV so in Wechselwirkung stehen. Ein solcher Effekt kann z. B. dadurch zustande kommen, dass ein bestimmter Übergang nur von der Protease, nicht aber vom Pro/Pol-Vorläufer prozessiert wird. Als Beispiel für einen solchen Effekt mag die partielle Blockierung der Spaltung 3C/3D bei PV dienen, die zu einer Störung der Prozessierung in der P2-Region beim PV führte (Kean et al., 1988). Um solche dominanten Fernwirkungen aufzudecken, wurden alle beschriebenen RHDV-Mutanten in dieser Richtung untersucht, ohne dass entsprechende Hinweise erhalten wurden. Da dabei aber nur nach der Anwesenheit von Proteinen gesucht und die resultierenden Prozessierungsprodukte nicht quantifiziert wurden, lassen sich Einflüsse auf die Kinetik der Prozessierung bisher nicht ausschließen.

Der Überblick zeigt, dass die Anordnung der Gene für die Nichtstruktur-Proteine (NSP) im Genom von RHDV sehr ähnlich zur Organisation der entsprechenden Region der RNA bei den Picornaviren ist. Die Lokalisation von VPg, Protease und Polymerase in der NSP-Region ist identisch (Abb. 23). Auch die ersten drei Proteine in dieser Region kann man schematisch einander zuordnen. Beim p37 (RHDV) sprechen Analysen der Sequenz und der Funktion dafür, dass es sich um das homologe Protein zur 2C-Helikase der Picornaviren handelt. Interessante Unterschiede bestehen für das p41 von RHDV und den entsprechenden Abschnitt des Picornavirus-Genoms 3AB. Bei 3AB handelt es sich um eine wichtige Komponente der Picornavirus-Replikation; 3B ist das Äquivalent zu VPg, ein hydrophiles Protein, von dem man annimmt, dass es an alle Picornavirus-RNAs angehängt wird. 3AB stellt dabei den Donor für 3B dar und 3A hat als hydrophobes Protein möglicherweise die Aufgabe, den Kontakt zu den Membranen herzustellen, an denen die RNA-Replikation stattfindet und sich der Replikationskomplex zusammenfindet (Takeda et al., 1986; Porter 1993). Folgt man dem Spaltungsmuster, wie es in der Abbildung 22 dargestellt ist, entspricht 3AB dem p18. Auch das p18 besteht aus einem hydrophoben N-Terminus, dem bisher noch nicht nachgewiesenen 5-kDa-Protein „X“, und einem eher hydrophilen VPg, das den carboxyterminalen Teil des p18 darstellt. So könnte also p18 das funktionelle Äquivalent zu 3AB repräsentieren. Im Lichte dieser Überlegung ist p23/2 ein Protein, das zwischen der Helikase und dem funktionellen 3AB-Homolog lokalisiert ist. Damit besitzt dieses Protein kein Gegenstück bei den Picornaviren. In einer schematischen Gegenüberstellung der NSP von RHDV und Poliovirus stellt das p23/2 damit den Hauptunterschied dar. Weitere Untersuchungen zur Struktur und Funktion der NSP bei RHDV werden sicherlich aufschlussreiche Einblicke erbringen, inwieweit sich die verwandten Virusfamilien der Calici- und Picornaviren bzw. ihre Genprodukte ähneln oder unterscheiden.

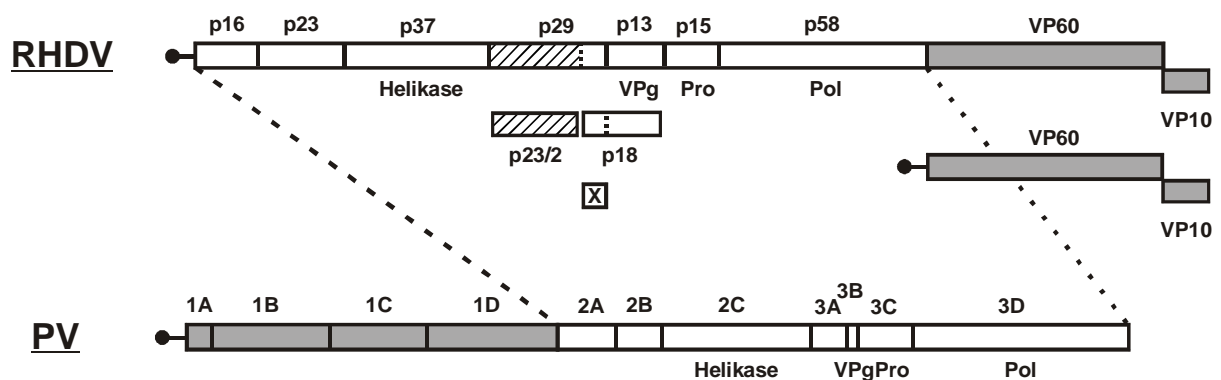


Abb. 23: Vergleich der Genomorganisation von RHDV und Poliovirus (PV)

Die Genome sind als Balken dargestellt und die für die einzelnen Proteine kodierenden Bereiche sind bezeichnet. Grau symbolisiert Abschnitte, die für Strukturproteine kodieren, weiß NSP; schraffiert ist das zusätzliche Protein der Caliciviren, p23/2.

Im Gegensatz zum 3A im Picornavirus-System konnte das kleine Protein vor dem VPg bis jetzt nicht dargestellt werden. Das in der Abbildung mit „X“ gekennzeichnete und in den Ergebnissen nach der erwarteten Größe als p5 beschriebene Protein wurde trotz intensiver Bemühungen nicht nachgewiesen. Auch mit einem speziellen polyklonalen Antiserum, das für diesen Zweck erzeugt wurde, gelang der Nachweis nicht. Als Ursache hierfür kommen mehrere Möglichkeiten in Betracht. Da das Protein p5 relativ klein ist, wird es auch eher schwach metabolisch markiert (es enthält nur je 1 Cystein und Methionin). Daher ist die Detektion gegen den Hintergrund u. U. schwierig. Sie sollte aber trotzdem möglich sein. Auch wurde versucht über spezifische Marker, die in die potentielle p5-Sequenz eingeführt wurden, den Nachweis zu führen. Dafür wurden zentral je ein zusätzliches Cystein und Methionin eingeführt. Sechs Histidine (His₆-„tag“) und ein zusätzliches Cystein bzw. der sogenannte „FLAG-tag“ der Firma Sigma wurden sowohl an zentraler Position im p5, als auch im Bereich des N- oder C-Terminus eingeführt. Die beiden letztgenannten Markierungen boten den Vorteil, dass kommerziell erhältliche monoklonale Antikörper gegen diese Sequenzen zur Verfügung standen. Auch diese Ansätze brachten in keinem Fall einen Nachweis für das p5 oder ermöglichten gar eine Reinigung dieses Proteins. Insgesamt stützten diese Experimente die Lokalisation des p5 unmittelbar vor dem VPg durch ein verändertes Laufverhalten einzelner Banden (p18, p41; nicht aber p23/2) in der PAGE, doch der direkte Nachweis des p5 über Radioimmunpräzipitation, Affinitätsreinigung oder im Western-Blot war nicht möglich.

Für die Schwierigkeiten beim Nachweis des p5 bieten sich mehrere Erklärungen an. Zum einen könnte in BHK-Zellen, die nicht die natürlichen Wirtszellen des RHDV darstellen, aus ungeklärter Ursache kein p5 entstehen. Zum Anderen könnte dieses hydrophobe Protein bei diesen Versuchen nicht von den Membranen gelöst worden sein und wäre dann der Detektion entgangen. Es könnte aber auch sein, dass das p18 wie das 3AB der Picornaviren den Donor für das VPg darstellt. Das p5 wäre dann eine Art Transportpeptid und entstünde nicht frei. Die alternative Spaltung über p29 könnte dann regulatorische Funktion besitzen. Dann könnte entweder die Spaltung an die Replikation des Virus gebunden sein, so dass die Prozessierung nach transienter Expression ganz unterbleibt, oder aber die funktionelle Rolle des Proteins nach erfolgter Prozessierung erfüllt sein und das freie p5 als nicht mehr verwertbares Produkt in der Zelle rasch degradiert werden.

4.2 Felines Calicivirus (FCV)

Das FCV stellt das System dar, mit dem in Zukunft weitergehende Analysen als beim RHDV möglich sein werden, da dieses Virus in Zellkultur vermehrbar ist. Zuvor muss aber erst der im Vergleich zum RHDV geringere Wissensstand in Bezug auf Genomorganisation und Polyproteinprozessierung erhöht werden. Der erste Schritt bei den Arbeiten zum FCV bestand in der Ermittlung der Nukleotidsequenz des verwendeten Stammes 2024, der zuvor noch nicht näher charakterisiert worden war. Aus der cDNA-Bibliothek waren aber nur Klone zu isolieren, die ca. 70 % des Genoms abdeckten. Die übrigen Anteile wurden durch direkte Sequenzierung von RT-PCR-Produkten bestimmt. Dabei bestand das Risiko, dass durch die PCR Mutationen hätten eingeführt werden können oder dass aufgrund von Sekundärstrukturen nur verkürzte Amplifikate bzw. Produkte mit Deletionen hätten entstehen können. Diese Vorbehalte waren erst nach Abschluss der Sequenzierung zu widerlegen. Im Vergleich mit den publizierten Sequenzen (Tab. 4) zeigte sich, dass die für den Stamm FCV2024 ermittelte Sequenz keine gravierenden Abweichungen aufweist. Eine Unsicherheit besteht für den 5'-NTR-Bereich, da die entsprechende Sequenz über das verwendete Oligonukleotid nach der Literatur vorgegeben war, so dass keine Aussage über die Sequenz am absoluten 5' Ende des viralen Genoms gemacht werden kann. Im Bereich des ORF1 entsprechen sich alle veröffentlichten Sequenzen weitgehend, lediglich die Sequenz von CFI/68 ist um genau 1 Aminosäure kürzer. Auch die Struktur des ORF2 ist wieder bei der Mehrzahl der Stämme gleich, nur F9 trägt eine Insertion von 3 zusätzlichen Kodons (kodierend für DNN) bei nt 6.797-6.805. Das vom ORF3 kodierte Protein ist bei allen Stämmen gleich groß. Die 3'-NTR hat auch fast bei allen die selbe Größe, nur der Stamm Urbana trägt einen Einschub von 2 Adeninen. Daraus folgt, dass die Stämme 2024, F4 und F65 auf Sequenzebene eine identische Struktur aufweisen und die Stämme F9, Urbana und CFI/68 nur geringfügig von dieser Konsensusstruktur abweichen. Die publizierten Prozessierungsstellen am N- und C-Terminus des VPg und zwischen „Leader“ und Hauptkapsidprotein sind bei allen 6 Stämmen konserviert.

In Tabelle 4 sind die Sequenzen der 6 FCV-Stämme auf Nukleotid- und Aminosäureebene verglichen. Es sind die identischen Positionen in Prozent im Vergleich zum Stamm 2024 angegeben. Der Stamm Urbana ist in der Tabelle zuerst aufgeführt, da für dieses Virus bereits ein infektiöser Klon publiziert wurde (Sosnovtsev und Green 1995) und damit dieser Stamm der interessanteste Vergleichspartner ist.

Genom-Abschnitt FCV-Stamm		5'-NTR (1 – 19)	ORF1 (20 – 5.311)	ORF2 (5.314 – 7.318)	ORF3 (7.317 – 7.634)	3'-NTR (ab 7.635)	ganzes Genom
Urbana	nt	100	80,3	78,1	84,4	85,4	80,0
	AS	-	92,5	89,6	95,3	-	-
F9	nt	100	79,9	78,6	84,1	87,5	79,9
	AS	-	92,1	88,1	92,5	-	-
F4	nt	100	79,0	79,0	85,0	87,5	79,4
	AS	-	88,5	89,1	91,6	-	-
F65	nt	100	79,7	77,1	86,0	89,6	79,4
	AS	-	89,7	88,1	95,3	-	-
CFI / 68	nt	100	79,6	77,8	85,7	85,1	79,5
	AS	-	91,0	89,6	95,3	-	-

Tab. 4: Vergleich der vollständig sequenzierten FCV-Stämme auf Nukleotid- und Aminosäure-Ebene. Die Werte geben Identität in Prozent zum Stamm 2024 an, auf den sich auch die nt-Positionen der Kopfzeile beziehen.

Nach Analyse der Sequenzdaten konnte man davon ausgehen, dass die Klone der cDNA-Bibliothek und die RT-PCR-Produkte wahrscheinlich eine sinnvolle Auswahl der natürlichen Varianz der genetischen Information des FCV-Stammes 2024 darstellen. Beim Versuch einen Gesamt-cDNA-Klon aufzubauen, zeigten sich bald Schwierigkeiten. Kürzere Teilstücke der cDNA ließen sich einfach in pBluescript klonieren. Ab einer bestimmten Größe bzw. wenn das Pro-Pol-Fragment enthalten war, traten entweder Fehler im Klon auf, oder es entstanden gar keine Bakterienkolonien. Eine mögliche Ursache für diesen Effekt könnte sein, dass ausgehend von kryptischen Promotoren virale Proteine exprimiert wurden, die so mit dem Bakterienstoffwechsel interagierten, dass die entsprechenden Klone einen deutlichen Nachteil gegenüber Klonen haben, die die virale Sequenz nicht oder in veränderter Form enthalten. Damit würden Klone mit korrekten Insertionen negativ ausselektiert werden. Alternativ kann auch die Nukleinsäuresequenz selbst ungewöhnliche Signale und Strukturen enthalten, die den Bakterienstoffwechsel stören. Dies würde dann auch erklären, weshalb die cDNA-Bibliothek keine größeren oder vollständigen Klone enthalten hat, denn auch bei dieser Methode werden nach *in vivo* Excision die Insertionen in pBluescript erhalten. Um diese Problematik zu umgehen, bieten sich verschiedene Möglichkeiten an. Ein Wechsel des Bakterienstammes hätte hilfreich sein können, allerdings nimmt dann auch häufig die Zahl der Klone

mit veränderter inserierter Sequenz zu. Eine andere Möglichkeit bestand darin, davon auszugehen, dass die Gendosis nicht unerheblichen Einfluss auf die Auswirkungen der beteiligten Sequenzen auf den Stoffwechsel der Bakterien hat. Da pBluescript ein „high copy plasmid“ ist, liegen u. U. bereits mehr als 50 Kopien der fraglichen Sequenz in der Zelle vor. Daher schien es aussichtsreich, den Aufbau des Gesamtklons in einem Plasmid fortzusetzen, das nur in einer oder wenigen Kopien in Bakterienzellen vorkommt. Die entsprechende Regulation erfolgt bei Bakterienvektoren über den Typ des Replikationsursprungs. Eine solche Sequenz, die für geringe Kopienzahl eines Plasmids sorgt, ist der p15A-Replikationsursprung, der im Plasmid pACYC177 enthalten ist. Das Plasmid pACYC177 wurde, wie beschrieben, verändert. Der weitere Aufbau erfolgte ohne größere Probleme. Es zeigte sich allerdings, dass sich bei den vorhandenen Teilklonen auf pBluescript-Basis einige Punktmutationen ereignet hatten, die weit entfernt von den Klonierungsschnittstellen lagen oder sogar in den Sequenzen, die über Oligonukleotide eingeführt worden waren und so bei Kontrollsequenzierungen relativ lange Zeit unentdeckt blieben. Der abschließende und entscheidende Test in Bezug auf die Funktionalität der klonierten Sequenzen bestand darin, aus der cDNA durch *in vitro* Transkription mit „cap“-Analog RNA zu generieren, damit CRFK-Zellen zu transfizieren und dadurch infektiöse FCV-Partikel *de novo* zu erzeugen. Nachdem dies gelungen war, konnte davon ausgegangen werden, dass die ermittelte Sequenz korrekt war und dass die eingeschleppten und eingeführten Mutationen gegenüber dieser ermittelten Sequenz ohne gravierende biologische Relevanz waren. Zudem war über die Veränderung des Nukleotids 1.309 (stumme Mutation) die zuverlässige Unterscheidung zwischen wt-FCV und infektiösem Klon auf Sequenz-Ebene möglich.

Nach erfolgreicher Transfektion der erstellten mRNA waren auch Vergleiche mit dem bisher einzigen publizierten infektiösen FCV-Klon (Sosnovtsev und Green, 1995) möglich. Dieses FCV-Konstrukt war der bislang einzige infektiöse Klon in der gesamten Familie Caliciviridae. Die publizierten Aussagen wurden durch diese Analysen voll bestätigt. So benötigt auch die 2024-RNA kein VPg für die Infektiosität. Es wurde aber sehr wohl eine 5'-terminale Modifikation benötigt, da alle Ansätze ohne „cap“-Analog nicht zu erfolgreichen Transfektionen führten.

In der Arbeit von Sosnovtsev und Green fehlte die weitergehende Charakterisierung des infektiösen Klons, so dass nur in Teilbereichen ein Vergleich mit den in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnissen stattfinden kann. Die Eigenschaften des vom infektiösen Klon abgeleiteten Virus waren mit denen des Wildtyps vergleichbar. So wurden beide Viren vermehrt und der Titer mit 5×10^7 bestimmt. Auch wurden Wachstumskurven erstellt und verglichen.

Es zeigten sich nur geringe Unterschiede, die wohl nur die natürlichen Messschwankungen widerspiegeln. Dabei wurde von beiden Viren ein Titer von 10^8 erreicht. Der Unterschied zum Titer des erstellten Virusstocks ergibt sich aus der verschiedenen m. o. i. beim Start der Experimente. Bei der Herstellung des Virusstocks war dieses Verhältnis nicht definiert und lag wahrscheinlich im Bereich von 0,1-1. Ziel war die möglichst rasche Gewinnung einer größeren Virusmenge. Bei der Wachstumskurve hingegen betrug die m.o.i. 0,00023 mit der Absicht, die Virusvermehrung über einen möglichst langen Zeitraum beobachten zu können.

Problematisch gestaltete sich die Generierung von infektiösem Virus durch *in vitro* Transkription und Transfektion der daraus erhaltenen RNA. Dies lag wohl an der Empfindlichkeit von RNA gegenüber äußeren Einflüssen und an der geringen Effizienz. Etwa ein Sechstel eines Reaktionsansatzes war erforderlich, um mit ausreichender Sicherheit infektiöses Virus nach der Transfektion zu erhalten. Die geringe Effizienz wurde vor allem beim Vergleich mit FCV-RNA deutlich. Mit den beschriebenen Versuchen gelang es, abzuschätzen, dass die wt-RNA bei der Transfektion mit Lipofectin etwa 300-mal effizienter ist. Eine naheliegende Erklärung ist, dass die Effizienzunterschiede eine Folge der unterschiedlichen Modifikationen am 5' Ende der RNA sind. So trägt die FCV-RNA das VPg mit 13 kDa und es ist zu erwarten, dass die Funktionen dieses Proteins nur teilweise durch das „cap“ zu ersetzen sind. Schon für das erheblich kleinere VPg der Picornaviren war gezeigt worden, dass es nicht nur wichtig für die Stabilität der RNA ist, sondern auch eine Rolle in der Replikation spielt (Rueckert 1996). Überraschend war bei FCV allerdings die Dimension, die dieser Unterschied annahm. In den dargestellten Experimenten ergab sich eine spezifische Infektiosität der *in vitro* transkribierten RNA von etwa 130 pfu/ μ g RNA genomischer Länge mit „cap“-Struktur. Sosnovtsev und Green hatten mit ihrem Klon eine Transfektionseffizienz von 300 pfu/ μ g RNA beschrieben. Diese war durch Verdünnungsexperimente ermittelt worden, allerdings liegen bei dieser Arbeit keine Angaben über die Qualität der RNA und den Anteil der Moleküle mit „cap“-Struktur vor. Der Ablauf der *in vitro* Transkription mit „cap“-Analog und der Transfektion mit Lipofectin war aber ähnlich, soweit sich dies aus der Literatur (Sosnovtsev und Green, 1995) entnehmen ließ. Es ist nicht grundsätzlich auszuschließen, dass diese Differenz zu den publizierten Daten eine Folge von Unterschieden auf Ebene der RNA-Sequenz ist. So weist der infektiöse Klon einige Abweichungen im Vergleich zur Konsensus-Sequenz von FCV2024 auf, deren Auswirkungen nur schwer einzuschätzen sind.

Als neuer Weg zur Generierung von infektiösem FCV ausgehend von klonierten Sequenzen wurde die Transfektion von Zellen mit cDNA-Konstrukten und Expression der viralen Proteine mittels Vaccinia-MVA-T7 etabliert. Ein solcher Ansatz lag zur Vereinfachung des Systems

zwar nahe, beinhaltet aber doch verschiedene mögliche Schwierigkeiten. Für RHDV war gezeigt worden, dass die T7-gesteuerte Expression von viralen Sequenzen in BHK-Zellen (Meyers et al., 2000) durchaus zu denselben Produkten führt, wie die Infektion primärer Hepatocyten (König et al., 1998). Dabei zeigte sich aber, dass einige Modifikationen von Proteinen wohl nicht so ablaufen, wie in der natürlichen Wirtszelle des Virus. Dies zeigte sich u. a. am Auftreten einer Doppelbande für das VPg in Hepatocyten, die nach Expression in BHK-Zellen nicht gefunden wurde. Ein weiteres Problem könnte darin bestehen, dass die Replikation des Vaccinia-Virus mit der Generierung infektiöser FCV-Partikel interferiert. Man konnte allerdings erwarten, dass das FCV sich erheblich rascher in seinen Wirtszellen vermehrt als Vaccinia-MVA. Es waren also keine Probleme dahingehend zu erwarten, dass Vaccinia-MVA die Zellen zerstört bevor FCV seinen Replikationszyklus abschließen konnte. Aufgrund dieser Überlegungen ist es keineswegs selbstverständlich, dass ein infektiöser Klon nach DNA-Transfektion und Expression zu infektiösen Partikeln führt, wie es mit dem infektiösen Klon des FCV-Stammes 2024 gelang. Es ist zudem bemerkenswert, dass die Generierung von infektiösem Virus auf diesem Wege sowohl in BHK- als auch in CRFK-Zellen gelang. BHK-Zellen stellen keine natürliche Wirtszelle des FCV dar und werden höchstwahrscheinlich von diesem Virus nicht infiziert. In CRFK-Zellen hätte dagegen das MVA-System nicht funktionieren können. In den Versuchen zeigte sich aber, dass die Produktion von infektiösen Partikeln in BHK gut möglich ist und Vaccinia-MVA nicht nur die bekannten 2 Zelltypen BHK und primäre Hühnerfibroblasen infizieren kann, sondern auch CRFK-Zellen. Somit ist die Herstellung von infektiösem FCV ausgehend vom infektiösen cDNA-Klon auf zwei verschiedenen Wegen möglich.

Die Chancen, die dieses System für die Zukunft bietet, wurden mit der Erstellung eines FCV-GFP-Replikons nur angedeutet. Dabei wurde die GFP-Sequenz als Fremdgen im ORF2 erfolgreich exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass die so erzeugte rekombinante RNA auch in FCV-Kapside verpackt wurde und nach erneuter Infektion wieder zur Expression von GFP führte. Auf Grund des Aufbaus des Konstruktes war dies aber nur mit wt-FCV als Helfervirus möglich, da das FCV-GFP-Replikon nicht mehr in der Lage war, ein Hauptkapsidprotein zur Verfügung zu stellen. Das FCV-GFP-Replikon stellt das erste System zur Expression eines fremden Genes auf Calicivirus-Basis dar. In weiteren Ansätzen können Untersuchungen zur Transkription und Replikation erfolgen, mit denen Proteinfunktionen bestimmt werden und cis-agierende RNA-Sequenzen detektiert und analysiert werden können.

Auch die proteinchemischen Experimente ergaben wichtige Ergebnisse. PCR-vermittelt wurden verschiedene Segmente der FCV-cDNA in Expressionsvektoren subkloniert und in Bak-

terien exprimiert. Die Ergebnisse waren dabei zum Teil sehr unterschiedlich. Einige Proteine waren über das pQE-System gut zugänglich und konnten dann auch einfach in für die Immunisierung ausreichender Menge und Reinheit isoliert werden. Andere Proteine konnten dagegen nur über das pEx-System gewonnen werden, womit in jedem Fall erheblich geringere Ausbeuten und deutlich gesteigerter Aufwand verbunden waren. Auch im pEx-System gelang es nicht, alle Proteine in ausreichender Menge zu erhalten. Dies ist auch der Grund dafür, dass die Antiseren B1, B2 und D1 noch nicht verfügbar sind. Die Ursache für dieses stark unterschiedliche Verhalten blieb unklar. Man kann annehmen, dass in einigen der viralen Proteine Aktivitäten oder Eigenschaften vorliegen, die das Wachstum der Bakterien behindern, wenn die entsprechenden Sequenzen korrekt exprimiert werden. Dies bleibt aber Spekulation, da über Funktionen und biologische Eigenschaften von Proteinen des FCV bisher nur ungenügende Daten vorliegen.

Mit den Antiseren, die bis jetzt vorliegen, konnten die Literaturangaben bestätigt und zusätzliche Daten ermittelt werden. So erkannte das Antiserum L ein Protein von etwa 9 kDa. Dies entspricht den Ergebnissen, die von Sosnovtsev und Green (2000) bereits veröffentlicht worden waren. Allerdings wurde dabei das VP10 in FCV-Virionen nachgewiesen. Bereits zuvor war das VP10 mit einer Größe von 12 kDa in infizierten Zellen beschrieben worden (Herbert et al., 1996). Eine Publikation bestätigt zwar die Größe mit etwa 10 kDa für dieses Protein, bestreitet aber das Vorhandensein dieses Proteins im Virion (Tohya et al., 1999).

Auch die Antiseren, die die bekannten Prozessierungsprodukte des ORF2-Polyproteins identifizieren sollten, präzipitierten Proteine mit Größen, die nach den publizierten Daten erwartet werden konnten. So wurde das Hauptkapsidprotein mit ungefähr 60 kDa erkannt; dies entspricht auch dem Ergebnis, das mit dem polyklonalen FCV-Serum erzielt wurde und war zu erwarten (Geissler et al., 1999). Vergleichbares galt für das zweite Produkt, das aus dem Vorläufer des Hauptkapsidproteins mit etwa 75 kDa hervorgeht. Dabei entstand ein Protein von knapp 12 kDa, das auch in dieser Größe erwartet worden war und in infizierten Zellen in größerer Menge nachweisbar war. Auch zu diesem Punkt lagen bereits entsprechende Literaturangaben vor (Sosnovtsev et al., 1998; Geissler et al., 1999; Tohya et al., 1999). Bei diesem Protein handelt es sich wahrscheinlich nicht um ein Strukturprotein, obwohl es aus dem ORF2 entsteht. Über die Funktion dieses Proteins gibt es bisher keine Vorstellungen. Das Protein ist bemerkenswert, da es in gleicher Menge wie das VP60 entstehen sollte, also eines der am stärksten exprimierten Proteine des Virus darstellt. Es ist zu erwarten, dass diesem Protein eine wichtige Funktion zukommt, die an die hohe Konzentration des Polypeptides in der Zelle gebunden ist.

Die Antiseren H und I gegen die Polymerase und die Protease können gemeinsam besprochen werden, da diese Antiseren beide nur ein Protein von ca. 70 kDa nachwiesen. Beschrieben war dieses Protein schon vorher (Sosnovtseva et al., 1999). Alle Signale von kleineren Banden waren im Verhältnis so schwach, dass sie vermutlich nicht von der regulären Polyproteinprozessierung herrührten. Dieses Ergebnis war äußerst überraschend, da bei RHDV klar gezeigt worden war, dass die Protease – zumindest in nicht geringem Anteil – als separates Protein entsteht. Dies galt für den Nachweis aus infizierten Hepatocyten (König et al., 1998) und für die *in vitro* Translation bzw. die transiente Expression in BHK-Zellen (Wirblich et al., 1995, 1996; Vázquez et al., 1998; Meyers et al., 2000). Auch bei den Picornaviren wird dieser Vorläufer zum Teil gespalten und die entsprechende Prozessierung hat eindeutig regulatorische Funktion (Porter 1993). Auch wurden von FCV bereits cDNA-Fragmente in Bakterien exprimiert, die für die 3C-ähnliche Protease und die Polymerase kodierten, und die Spaltprodukte, die durch die Protease aus diesem Polypeptid erzeugt wurden, identifiziert. N-terminale Proteinsequenzierung durch Edman-Abbau erlaubte es, zwei Spaltstellen zu bestimmen. Dabei handelte es sich um Positionen, die C-terminal von der Protease lokalisiert waren (Sosnovtseva et al., 1999). Die weiter C-terminal lokalisierte Schnittstelle war allerdings mitten in der RNA-Polymerase lokalisiert. Mit der vorderen dieser beiden Spaltstellen entstünde dann eine Protease mit etwa 30 kDa, die aus dem Vorläufer mit der Polymerase durch Spaltung eines ET-Dipeptids freigesetzt würde. Parallel entstünde eine Polymerase mit etwa 48 kDa. Damit wäre die FCV-Protease erheblich größer als die von RHDV und auch größer als alle picornaviralen Homologen, während die Polymerase erheblich kleiner wäre als vergleichbare Enzyme anderer Viren. Andererseits liegt mittlerweile eine Veröffentlichung vor, die nachweist, dass das 70-kDa-Protein von FCV Polymerase-Funktion besitzt, während kleinere Produkte, die nach einer möglichen Spaltung entstehen könnten, zumindest im getesteten System keine oder nur verminderte RNA-Polymerase-Aktivität besitzen (Wei et al., 2001). Daher bedarf es weiterer Untersuchungen, um die Funktionalität der Spaltungen des Pro-Pol-Vorläufers in der infizierten Zelle zu zeigen oder zu widerlegen.

Das VPg wurde in der Literatur bereits ausführlich beschrieben. So war zu erwarten, dass ein Protein von knapp 13 kDa mit einem entsprechenden Antiserum nachweisbar sein sollte, was auch zutraf. Für das FCV-VPg waren die Lokalisation in Bezug auf das Genom, die Spaltstellen der viralen Protease am N- und C-Terminus, die kovalente Bindung an die viralen RNAs und Untersuchungen zur Funktion (Beteiligung an der Translation) bereits veröffentlicht gewesen (Schaffer et al., 1980; Herbert et al., 1997; Dunham et al., 1998; Sosnovtseva et al., 1999; Sosnovtsev und Green 2000). Mit den in dieser Arbeit erstellten Seren gelang aber zum

ersten Mal der Nachweis, dass auch bei FCV ein 41-kDa-Vorläufer entsteht, der das VPg beinhaltet und dass ein weiteres Prozessierungsprodukt von 28 kDa unmittelbar vor dem VPg lokalisiert ist und voraussichtlich aus dem selben Vorläufer entsteht. Neu ist auch, dass N-terminal von diesem p41 ein Polypeptid von ca. 37 kDa im Polyprotein lokalisiert ist. Dieses Protein besitzt Ähnlichkeit mit dem 2C-Protein von Picornaviren und dem p37 von RHDV, wie aus den Sequenzvergleichen zu erwarten war (Clarke und Lambden 1997). Allerdings gibt es noch keine Daten zur Funktion dieses Proteins, so dass die Zuordnung zur Helikase (2C-like) in der Abbildung 24 mit einem Fragezeichen versehen wurde.

Auch für das Protein mit etwa 30 kDa, das mit dem Antiserum A („p16“) nachgewiesen wurde, gibt es in der Literatur bislang keine Entsprechungen. Aufgrund der Lokalisation der Sequenzen mit denen das entsprechende Antiserum erzeugt wurde, sind 2 unterschiedliche Anordnungen zu diskutieren. Es könnte sich um das aminoternale Spaltstück des Polyproteins handeln, so dass es formal dem p16 von RHDV entspräche. Alternativ könnte es aber auch das zu p23 (RHDV) analoge Protein sein. Im letzteren Falle würde ein vermutlich kurzes, aminoternales Spaltstück fehlen, das vom Antiserum A nicht erkannt wird oder so kurzlebig ist, dass es mit der verwendeten Methodik nicht nachzuweisen war. Betrachtet man die Ergebnisse der Kinetik für das RHDV-p16, ist diese Möglichkeit nicht von der Hand zu weisen. Es könnte aber auch sein, dass das p30 eine Art Fusionsprotein darstellt, das die Funktionen des p16 und des p23 von RHDV vereinigt und nicht weiter prozessiert wird. Die Lokalisation des p30 ist also noch nicht exakt möglich. Zusätzlich zum p30 und dem weiter oben beschriebenen p37 könnten auch noch ein oder mehrere Proteine in diesem Bereich lokalisiert sein. Dies ergibt sich aus einem Vergleich der Summe der Größen der detektierten Proteine mit der theoretischen Kodierungskapazität dieses Bereichs des ORF1.

Aus den Ergebnissen liess sich eine vorläufige Genomorganisation, wie sie oben in Abbildung 21 dargestellt worden ist, ableiten. Interessant ist nun die Gegenüberstellung der Daten zum RHDV und zum FCV, wie sie die folgende Abbildung 24 zeigt.

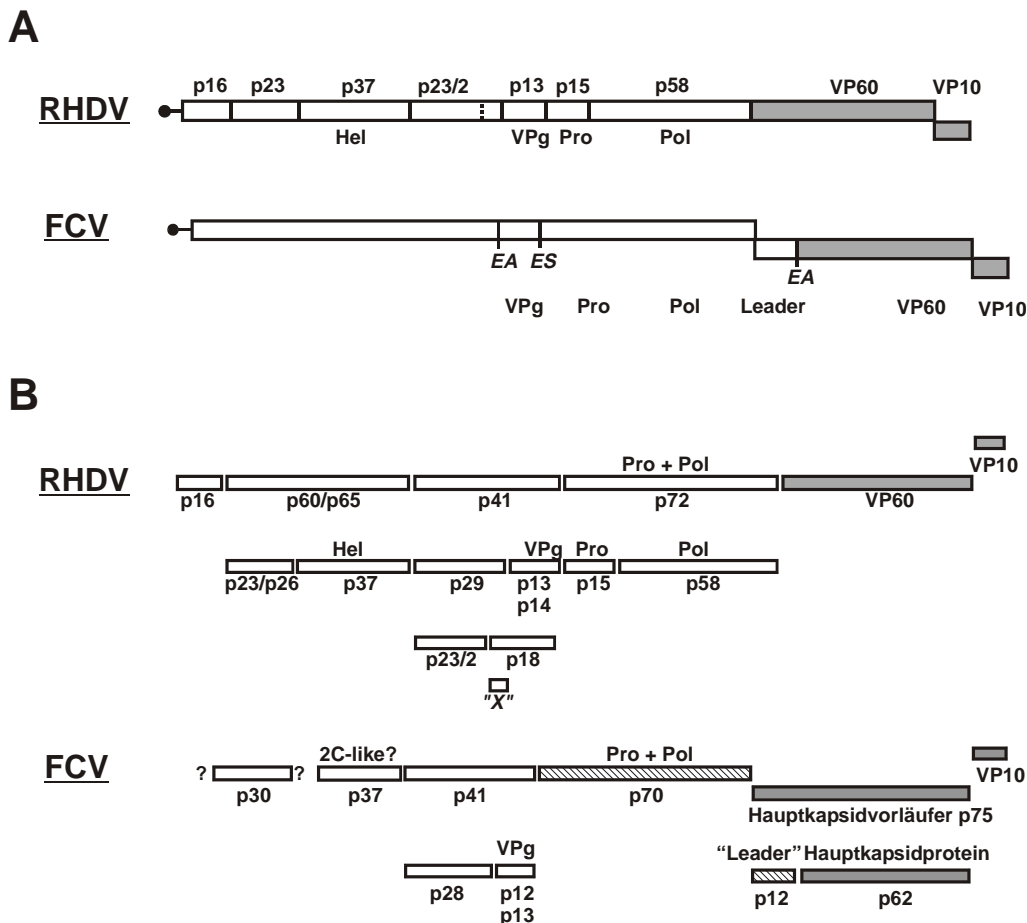


Abb. 24: Vergleich der Genomorganisation von RHDV und FCV (soweit bekannt).

Für beide Viren ist in A die genomische RNA dargestellt, soweit sie Protein kodiert. Am 5'-Ende tragen sie ein VPg (schwarzer Punkt). Die jeweiligen Leseraster-Wechsel sind durch die Versetzungen in den Balken gekennzeichnet. Die Strukturprotein-(enthaltenden) Bereiche sind als graue Balken gezeigt. Bei RHDV stehen die Polyproteinprozessierungsprodukte mit ihren Größen über dem ORF1/2-Balken und darunter, soweit bekannt, die Funktionen. Bei FCV sind in den ORF1 und 2 repräsentierenden Balken die bekannten Protease-Schnittstellen der jeweils abgeleiteten Polyproteine im 1-Buchstaben-Code eingefügt. Die bekannten Funktionen der abgeleiteten Proteine stehen an der entsprechenden Position unter dem jeweiligen ORF. B: Nachgewiesene Polyproteinprozessierungsprodukte bei RHDV (oben) und FCV (unten). Kleinere Fragmente entstehen formal aus den größeren, darüberstehenden Prozessierungsprodukten. Kapsidprotein-Anteile sind durch graue Balken symbolisiert; die gesicherten deutlichen Differenzen in der Genomorganisation von RHDV und FCV sind bei FCV hervorgehoben: 3 statt 2 ORFs, Leader vor dem Hauptkapsidprotein und Protease mit Polymerase als nicht-prozessierte Einheit.

Das ORF3-Genprodukt von FCV ist nach Lage, Größe und vermuteter Funktion dem ORF2-Genprodukt von RHDV vergleichbar. Auffällig ist, dass FCV sein Kapsidprotein über einen separaten ORF exprimiert und damit 3 statt 2 ORFs besitzt. Auch die Existenz des „Leaders“ war bekannt und stellt einen Unterschied dar, für den sich bislang noch keine Funktion oder Erklärung gefunden hat. Auch die Helikase und das VPg scheinen in Größe, Funktion und Lokalisation vergleichbar. Andererseits treten im ORF1 nicht unerhebliche Unterschiede auf. Diese betreffen die Polymerase und Protease. Hier exprimiert RHDV zwei separate Proteine und auch der gemeinsame Vorläufer besitzt möglicherweise eine (andere) Funktion. Weiter

N-terminal sind die Angaben zu diesem Bereich natürlich sehr vorläufig. Am äußersten N-Terminus besteht allerdings sicher ein Unterschied. Ob dieser lediglich die Größe einzelner Proteine betrifft oder einen grundsätzlichen Unterschied in der Organisation beschreibt, lässt sich gegenwärtig noch nicht entscheiden.

Mit den im Rahmen dieser Arbeit erstellten Antiseren war es also möglich, grundsätzliche Fragen zur Genomorganisation von FCV zu bearbeiten. Sobald die letzten Seren fertiggestellt sein werden, sollte die Vervollständigung der FCV-Genomkarte möglich sein.

Die Antiseren bilden zudem die Voraussetzung für zukünftige Projekte z. B. im Zusammenhang mit der Aufklärung von Funktionen einzelner Proteine oder Fragen zu Replikations- und Transkriptionsmechanismen von Caliciviren. Die Etablierung des infektiösen FCV-Klons und die Herstellung von Antiseren mit Spezifitäten gegen definierte Regionen der Translationsprodukte von FCV stellen eine Basis für zukünftige Arbeiten dar.

5 Zusammenfassung

Die Familie Caliciviridae gliedert sich zur Zeit in 4 Genera. Der molekularbiologisch und proteinchemisch am besten untersuchte Vertreter ist das „rabbit hemorrhagic disease virus“ RHDV. Für dieses Virus des Genus Lagovirus waren die Genomorganisation und Polyproteinprozessierung weitgehend bekannt und es lagen ausführliche Untersuchungen zur Funktion einzelner Proteine vor. Lücken im Bezug auf diese Punkte bestanden noch im Zusammenhang mit der Prozessierung des zentralen Bereichs des ORF1-Polyproteins und der endgültigen Identifizierung von 4 der 8 vermuteten Prozessierungsschnittstellen. In diesen Punkten sollten die Daten ergänzt und die Untersuchungen möglichst weitgehend abgeschlossen werden. Mit einem transienten Expressionssystem wurden 3 der 4 noch nicht eindeutig identifizierten Spaltstellen im ORF1-Polyprotein identifiziert. Dabei handelt es sich um die Spaltstelle zwischen p16 und p23, die von Glutaminsäure und Glycin flankiert wird und diejenige zwischen p23 und p37, an der zwischen Glutaminsäure und Asparaginsäure prozessiert wird. Die dritte neu identifizierte Spaltstelle trennt p29/p5 und VPg und wird durch das Dipeptid Glutamin und Glycin gebildet. Diese Spaltstellen passen aufgrund ihrer Sequenzen auch zu den beschriebenen Anforderungen der viralen Protease.

Die Position der letzten, noch nicht identifizierten Spaltstelle am C-Terminus von p23/2 wurde mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenfalls bestimmt. In diesem Fall wird ein Dipeptid aus Asparaginsäure und Arginin prozessiert. Es gibt gute Hinweise, dass diese Spaltung nicht durch die bekannte Protease des RHDV erfolgt.

Bei Analysen der Auswirkungen von Blockierungen der Prozessierung an einzelnen Spaltstellen wurden für Caliciviren zum erstenmal hierarchische Ordnungen der Polyproteinprozessierung entdeckt. So verändert die Verhinderung der Spaltung zwischen p16 und p23 auch das Spaltverhalten zwischen p23 und p37. Bei Blockierung der Spaltung am N-Terminus von p41 erfolgt sogar keine weitere Prozessierung innerhalb dieses Polypeptides mehr.

Zum erstenmal wurden auch Untersuchungen zu kinetischen Aspekten der Polyproteinprozessierung durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass sich bereits nach sehr kurzer Zeit ein Fließgleichgewicht zwischen allen Prozessierungsprodukten einstellt und dann über den gesamten Beobachtungszeitraum im Wesentlichen konstant bleibt. Ein anderes Verhalten zeigte lediglich das p16, dessen Konzentration nach einer Stunde eindeutig ein Maximum erreichte und danach wieder deutlich abnahm.

In Bezug auf die Genomorganisation wurde Klarheit über die Spaltprodukte, die aus dem zentralen Bereich des ORF1-Polyproteins entstehen, erzielt. Das in der Literatur mit unklarer Position beschriebene p5 konnte zwischen p23/2 und VPg lokalisiert werden, auch wenn der direkte Nachweis dieses Prozessierungsproduktes trotz vielfältiger Ansätze in dieser Arbeit nicht gelang.

Für zukünftige Untersuchungen bleibt allerdings die Problematik bestehen, dass für das RHDV kein Gewebekultursystem zur Verfügung steht und alle Analysen daher in mehr oder weniger artifiziellen Systemen erfolgen müssen. Eine Möglichkeit, in der Zukunft weiterführende Analysen zur Molekularbiologie von Caliciviren durchzuführen, besteht darin, das FCV (Felines Calicivirus) aus dem Genus Vesivirus als Modellsystem zu verwenden, da dieses Virus gut in Gewebekultur vermehrbar ist. Dies erfordert aber noch erhebliche Vorarbeiten, da für dieses Virus das molekularbiologische und proteinchemische Wissen deutlich geringer ist als für das RHDV. So war ein Ziel dieser Arbeit, Grundlagen für die Erforschung des FCV zu legen und zu klären, inwieweit die Viren vergleichbar sind oder ob gravierende Unterschiede bestehen, bzw. substantielle Vorarbeiten für die Klärung dieser Frage zu leisten. Dazu wurde für den FCV-Stamm 2024 eine cDNA-Bibliothek des Genoms angelegt und ausgehend von der cDNA die Nukleotidsequenz bestimmt. Darüber hinaus wurde ein cDNA-Gesamtklon etabliert, der die gesamte genetische Information des Virus enthält. Es konnte gezeigt werden, dass von diesem Klon infektiöse RNA transkribiert werden kann. Das daraus resultierende Virus unterscheidet sich in den untersuchten biologischen Eigenschaften nicht wesentlich vom wt-FCV, von dem der cDNA-Klon abgeleitet wurde. Der etablierte cDNA-Klon stellt den weltweit zweiten infektiösen Klon eines Calicivirus dar. Es wurde eine Methode etabliert, die die effiziente Herstellung von infektiösem FCV durch Transfektion von Plasmiden erlaubt, so dass, zumindest für viele Untersuchungen, die zeitraubende und kostspielige Herstellung von cRNA mit 5' „cap“-Struktur durch *in vitro* Transkription unterbleiben kann. Dies ist auch in Zellen möglich, die von FCV nicht infiziert werden können.

Auf Basis des infektiösen Klons war auch die Expression eines Fremdgens (GFP) möglich, ohne dass die RNA-Replikation entscheidend gestört wurde. Die entsprechende RNA wurde in Anwesenheit von wt-FCV als Helfervirus in Partikel verpackt und war in der Lage, neue Zellen zu infizieren.

In Anlehnung an die Untersuchungen zur Genomorganisation von RHDV wurden auch für das FCV Genomsegmente mittels PCR amplifiziert und in Bakterien exprimiert. Daraus resultierende Proteine wurden aufgereinigt und zur Immunisierung von Kaninchen verwendet. Mit den erhaltenen polyklonalen Antisera wurden mit FCV infizierte CRFK-Zellen analysiert

und aus den gewonnenen Daten ließ sich eine vorläufige Genomorganisation für dieses Virus ableiten.

6 Literatur

Alonso, J. M. M.; Casais, R.; Boga, J. A. and Parra, F. (1996): Processing of rabbit hemorrhagic disease virus polyprotein. *J. Virol.* **70**, 1.261-1.265.

Baulch-Brown, C.; Love, D. and Meanger J. (1999): Sequence variation within the capsid protein of Australian isolates of feline calicivirus. *Vet. Microbiol.* **68** (1-2), 107-117.

Barrett, A. J. and Rawlings, N. D. (2001): Evolutionary lines of cysteine peptidases. *Biol. Chem.* **382**, 727-733.

Bazan, J. F. and Fletterick, R. J. (1988): Viral cysteine proteases are homologous to the trypsin-like family of serin proteases: Structural and functional implications. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* **85**, 7.872-7.876.

Boga, J. A.; Alonso, J. M. M.; Casais, R. and Parra F. (1997): A single dose immunization with Rabbit Hemorrhagic Disease Virus major capsid protein produced in *Saccharomyces cerevisiae* induces protection. *J. Gen. Virol.* **78**, 2.315-2.318.

Boniotti, B.; Wirblich, C.; Sibilia, M.; Meyers, G.; Thiel, H.-J. and Rossi, C. (1994): Identification and characterization of a 3C-like protease from Rabbit Hemorrhagic Disease Virus, a calicivirus. *J. Virol.* **68** (10), 6.487-6.495.

Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

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.

Capucci, L.; Fusi, P.; Lavazza, A.; Pacciarini, M.L. and Rossi, C. (1996): Detection and Characterization of a new rabbit calicivirus related to rabbit hemorrhagic disease virus but nonpathogenic. *J. Virol.* **70**, 8.614-8.623.

Carmichael, G. G. and McMaster, G. K. (1980): The analysis of nucleic acids in gels using glyoxal and acridine orange. *Methods Enzymol.* **65**, 380-391.

Carter, M. J. (1990): Transcription of Feline Calicivirus RNA. *Arch. Virol.* **114**, 143-152.

Carter, M. J.; Milton, I. D.; Meanger, J.; Bennett, M.; Gaskell, R. M. and Turner, P. C. (1992a): The complete nucleotide sequence of a feline calicivirus. *Virology* **190**, 443-448.

Carter, M. J.; Milton, I. D.; Turner, P. C.; Meanger, J.; Bennett, M. and Gaskell, R. M. (1992b): Identification and sequence determination of the capsid protein gene of Feline Calicivirus. *Arch. Virol.* **122**, 223-235.

- Chiang, M.-Y.; Chan, H.; Zounes, M. A.; Freier, S. M.; Lima, W. F. and Bennett, C. F. (1991): Antisense nucleotides inhibit intercellular adhesion molecule 1 expression by two distinct mechanisms. *J. Biol. Chem.* **266** (27), 18.162-18.171.
- Chirgwin, J. M.; Przybyla, A. E.; MacDonald, R. J. and Rutter, W. J. (1979): Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18**, 5.294-5.299.
- Clarke, I. N. and Lambden, P. R. (1997): The molecular biology of caliciviruses. *J. Gen. Virol.* **78**, 291-301.
- Clarke, I. N. and Lambden, P. R. (2000): Organization and expression of calicivirus genes. *J. Inf. Dis.* **181** (Suppl. 2); S309-S316.
- Cohen, L.; Kean, K. M.; Girard, M. and Van der Werf, S. (1996): Effects of P2 cleavage site mutations on poliovirus protein processing. *Virology* **224**, 34-42.
- Crowe, J.; Döbeli, H.; Gentz, R.; Hochuli, E.; Stüber, D. and Henco, K. (1994): 6xHis-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification. In: *Methods in Molecular Biology: Protocols for Gene Analysis* (A. J. Harwood, ed.) **31**, 371-387.
- Devereux, J.; Haeberli, P. and Smithies, O. (1984): A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* **12**, 387-395.
- Doultree, J. C.; Druce, J. D.; Birch, C. J.; Bowden, D. S. and Marshall, J. A. (1999): Inactivation of Feline Calicivirus, a Norwalk Virus surrogate. *J. Hosp. Infec.* **41**, 51-57.
- Dunham, D. M.; Jiang, X.; Berke, T.; Smith, A. W. and Matson, D. O. (1998): Genomic mapping of a calicivirus VPg. *Arch. Virol.* **143**, 2.421-2.430.
- Ehresmann, D. W. and Schaffer, F. L. (1977): RNA synthesized in calicivirus-infected cells is atypical of picornaviruses. *J. Virol.* **22**, 572-583.
- El Mehdaoui, S.; Touzé, A.; Laurent, S.; Sizaret, P.-Y.; Rasschaert, D. and Coursaget, P. (2000): Gene transfer using recombinant Rabbit Hemorrhagic Disease Virus capsids with genetically modified DNA encapsidation capacity by addition of packaging sequences from the L1 or L2 protein of Human Papillomavirus Type 16. *J. Virol.* **74** (22), 10.332-10.340.
- Felgner, P. L.; Gadek, T. R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H. W.; Wenz, M.; Northrop, J. P.; Ringold, G. M. and Danielson, M. (1987): Lipofectin: A highly efficient, lipid-mediated DNA transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 7.413-7.417.
- Fuchs, A. and Weissenböck, H. (1992): Comparative histopathological study of Rabbit Hemorrhagic Disease (RHD) and European Brown Hare Syndrome (EBHSV). *J. Comp. Path.* **107**, 103-113.
- Fürst, T.R.; Niles, E.G.; Studier, F.W. and Moss, B. (1986): Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 8.122-8.126.

Geissler, K.; Schneider, K.; Fleuchaus, A.; Parrish, C. R.; Sutter, G. and Truyen, U. (1999): Feline calicivirus capsid protein expression and capsid assembly in cultured feline cells. *J. Virol.* **73**, 834-838.

Glass, P. J.; White, L. J.; Ball, J. M.; Leparac-Goffart, I.; Hardy, M. E. and Estes, M. K. (2000): Norwalk Virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein. *J. Virol.* **74**, 6.581-6.591.

Gorbalenya, A. E.; Donchenko, A. P.; Blinov, V. M. and Koonin, E. V. (1989): Cysteine proteases of positive strand RNA viruses and chymotrypsin-like serin proteases. *FEBS Let.* **243** (2), 103-114.

Green, K. Y.; Ando, T.; Balayan, M. S.; Berke, T.; Clarke, I. N.; Estes, M. K.; Matson, D. O.; Nakata, S.; Neill, J. D.; Studdert, M. J. and Thiel, H.-J. (2000): Taxonomy of caliciviruses. *J. Inf. Dis.* **181** (Suppl. 2), S322-S330.

Green, K. Y.; Ando, T.; Balayan, M. S.; Berke, T.; Clarke, I. N.; Estes, M. K.; Matson, D. O.; Nakata, S.; Neill, J. D.; Studdert, M. J. and Thiel, H.-J. (2000): Family Caliciviridae. In: Regenmortel, M. H. V.; Fauquet, C. M. and Bishop, D. H. L.: *Virus Taxonomy*; 725-734; Academic Press, New York.

Gubler, U. and Hoffmann, B. J. (1983): A simple and very effective method for generating cDNA libraries. *Gene* **25**, 263-269.

Hahn, H. and Palmenberg, A. C. (2001): Deletion mapping of the Encephalomyocarditis Virus primary cleavage site. *J. Virol.* **75** (15), 7.215-7.218.

Hall, D. J. and Palmenberg, A. C. (1996): Cleavage site mutations in the encephalomyocarditis virus P3 region lethally abrogate the normal processing cascade. *J. Virol.* **70**, 5.954-5.961.

Herbert, T. P.; Brierley, I. and Brown, T. D. K. (1996): Detection of the ORF3 polypeptide of feline calicivirus in infected cells and evidence for its expression from a single, functionally bicistronic, subgenomic mRNA. *J. Gen. Virol.* **77**, 123-127.

Herbert, T. P.; Brierley, I. and Brown, T. D. (1997): Identification of a protein linked to the genomic and subgenomic mRNA of feline calicivirus and its role in translation. *J. Gen. Virol.* **78**, 1.033-1.040.

Hochuli, E.; Döbeli, H. and Schacher, A. (1987): New metal chelate adsorbent is selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J. of Chromatography* **411**, 177-184.

Jiang, X.; Wang, M.; Graham, D. J. and Estes, M. K. (1992): Expression, self-assembly, and antigenicity of norwalk virus capsid protein. *J. Virol.* **66**, 6.527-6.532.

Joubert, P.; Pautigny, C.; Madelaine, M.-F. and Rasschaert, D. (2000): Identification of a new cleavage site of the 3C-like protease of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus. *J. Gen. Virol.* **81**, 481-488.

- Jung, J. Y.; Lee, B. J.; Tai, J. H.; Park, J. H. and Lee, Y. S. (2000): Apoptosis in rabbit hemorrhagic disease. *J. Comp. Pathol.* **123** (2-3), 135-140.
- Kadoi, K. and Kadoi, B. K. (2001): Stability of Feline Calicivirus in marine water maintained at different temperatures. *New Mikrobiol.* **24** (1), 17-21.
- Kapikian, A. Z.; Estes, M. K. and Chanock, R. M.. (1996): Norwalk group of viruses. In: Fields Virology; eds. Fields, B. N.; Knipe, D. M. and Howley, P. M.; Lippincott-Raven, Philadelphia, 783-810.
- Kaplan, J. E.; Gary, G. W.; Baron, R. C.; Singh, N.; Schronberger, L. B.; Feldman, R. and Greenberg, H. B. (1982): Epidemiology of Norwalk gastroenteritis and the role of Norwalk Virus in outbreaks of acute non-bacterial gastroenteritis. *Ann. Intern. Med.* **96**, 756-761.
- Kean, K. M.; Agut, H.; Fichot, O.; Wimmer, E. and Girard, M. (1988): A poliovirus mutant defective for self-cleavage at the COOH-terminus of the 3C protease exhibits secondary processing defects. *Virology* **163**, 330-340.
- Keil, G. M.; Ebeling-Keil, A. and Koszinowski, U. H. (1984): Temporal regulation of murine cytomegalovirus transcription and mapping of viral RNA synthesized at immediate early times after infection. *J. Virol.* **50**, 784-795.
- Kessler, S. W. (1981): Use of protein A-bearing staphylococci for the immunoprecipitation and isolation of antigens from cells. *Methods Enzymol.* **73**, 442-459.
- Kimura, T.; Mitsui, I.; Okada, Y.; Furuya, T.; Ochiai, K.; Umemura, T. and Itakura, C. (2001): Distribution of Rabbit Haemorrhagic Disease Virus RNA in experimentally infected rabbits. *J. Comp. Pathol.* **124** (2-3); 134-141.
- König, M.; Thiel, H.-J. and Meyers, G. (1998): Detection of viral proteins after infection of cultured hepatocytes with Rabbit Hemorrhagic Disease Virus. *J. Virol.* **72** (5), 4.492-4.497.
- Kuhn, R. J. and Wimmer, E. (1987): The replication of picornaviruses. In: The molecular biology of the positive strand RNA viruses. Eds.: Rowlands, D. J.; Mayo, M. A. and Mahy, B. W. J.; Academic Press, London, 17-51.
- Langone, J. J. and Vunakis, H. V. (eds., 1981): Immunochemical Techniques. In: *Methods in Enzymology* **73**, Part B, Section IV, 442-470.
- Laurent, S.; Vautherot J.-F.; Madelaine, M.-F.; Le Gall, G. and Rasschaert, D. (1994): Recombinant rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein expressed in baculovirus self-assembles into viruslike particles and induces protection. *J. Virol.* **68**, 6.794-6.798.
- Laurent, S.; Vautherot J.-F.; Le Gall, G.; Madelaine, M.-F. and Rasschaert, D. (1997): Structural, antigenic and immunogenic relationships between European Brown Hare Syndrome Virus and Rabbit Hemorrhagic Disease Virus. *J. Gen. Virol.* **78**, 2.803-2.811.
- Le Gall, G.; Huguet, S.; Vende, P.; Vautherot, J. F. and Rasschaert, D. (1996): European Brown Hare Syndrome Virus: Molecular cloning and sequencing of the genome. *J. Gen. Virol.* **77**, 1.693-1.697.

- Lew, J. F.; Petric, M.; Kapikian, A. Z.; Jiang, X.; Estes, M. K. and Green, K. Y. (1994): Identification of minireovirus as a Norwalk-like virus in pediatric patients with gastroenteritis. *J. Virol.* **68**, 3.391-3.396.
- Lindner, K. E. (2000): Die Viren. In: *Urania Pflanzenreich*; Bd.: Viren, Bakterien, Algen, Pilze; Urania Verlag, Berlin, 82.
- Liu, S. J.; Xue, H. P.; Pu, B. Q. and Quian, N. H. (1984): A new viral disease in rabbits. *Animal husbandry and Vet. Med.* **16**, 253-255; Ref. in: *Vet. Bull.* **55** (1985), 688, Abstr. 5.600.
- Liu, B. L.; Viljoen, G. J.; Clarke, I. N. and Lambden, P. R. (1999): Identification of further proteolytic cleavage sites in the Southampton calicivirus polyprotein by expression of the viral protease in *E. coli*. *J. Gen. Virol.* **80**, 291-296.
- Machin, A.; Martin Alonso, J. M. and Parra, F. (2001): Identification of the amino acid residue involved in Rabbit Hemorrhagic Disease Virus VPg uridylation. *J. Biol. Chem.* **276** (30), 27.787-27.792.
- Malone, R. W.; Felgner, P. L. and Verma, I. M. (1989): Cationic liposome mediated RNA transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 6.077-6.081.
- Marin, M. S.; Casais, R.; Alonso, J. M. and Parra, F. (2000): ATP binding and ATPase activities associated with recombinant rabbit hemorrhagic disease virus 2C-like polypeptide. *J. Virol.* **74**, 10.846-10.851.
- Matsuura, Y.; Tohya, Y.; Onuma, M.; Roerink, F.; Mochizuki, M. and Sugimura, T. (2000): Expression and processing of the canine calicivirus precursor. *J. Gen. Virol.* **81**, 195-199.
- Meyers, G. (1990): Virus der klassischen Schweinepest – Genomanalyse und Vergleich mit dem Virus der Bovinen Viralen Diarrhöe. Dissertation, Tübingen.
- Meyers, G.; Wirblich, C. and Thiel, H.-J. (1991a): Rabbit hemorrhagic disease virus - molecular cloning and nucleotide sequencing of a calicivirus genome. *Virology* **184**, 664-676.
- Meyers, G.; Wirblich, C. and Thiel, H.-J. (1991b): Genomic and subgenomic RNAs of rabbit hemorrhagic disease virus are both protein-linked and packaged into particles. *Virology* **184**, 677-686.
- Meyers, G., Wirblich, C.; Thiel, H.-J. and Thumfart, J. O. (2000): Rabbit hemorrhagic disease virus: Genome organization and polyprotein processing of a calicivirus studied after transient expression of cDNA constructs. *Virology* **276** (2), 349-363.
- Moss, B. (1996): Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** (21), 11.341-11.348.
- Neill, J. D. (1990): Nucleotide sequence of a region of the Feline Calicivirus genome which encodes picornavirus-like RNA-dependent RNA-polymerase, cystein protease and 2C polypeptides. *Virus Research* **17**, 145-160.
- Neill, J. D.; Reardon, I. M. and Heinrikson, R. L. (1991): Nucleotide sequence and expression of the capsid protein gene of Feline Calicivirus. *J. Virol.* **65**, 5.440-5.447.

Ohlinger, V. F.; Haas, B.; Ahl, R. und Weiland, F. (1989): Die infektiöse hämorrhagische Krankheit der Kaninchen - eine durch ein Calicivirus verursachte Tierseuche. *Tierärztl. Umschau* **44**, 284-294.

Ohlinger, V. F.; Haas, B.; Meyers, G.; Weiland, F. and Thiel, H.-J. (1990): Identification and characterization of the virus causing rabbit hemorrhagic disease. *J. Virol.* **64**, 3.331-3.336.

Oshikamo, R.; Tohya, Y.; Kawaguchi, Y.; Tomonaga, K.; Maeda, K.; Takeda, N.; Utagawa, E.; Kai, C. and Mikami, T. (1994): The molecular cloning and sequence of an open reading frame encoding for non-structural proteins of Feline Calicivirus F4 strain isolated in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* **56** (6), 1.093-1.099.

Palmenberg, A. C. (1987): Genome organization, translation and processing in Picornaviruses. Eds.: Rowlands, D. J.; Mayo, M. A. and Mahy, B. W. J.; Academic Press, London, 1-16.

Parra, F. and Prieto, M. (1990): Purification and characterization of a calicivirus as the causative agent of a lethal hemorrhagic disease in rabbits. *J. Virol.* **64**, 4.013-4.015.

Paul, A. V.; van Boom, J. H.; Filippov, D. and Wimmer, E. (1998): Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. *Nature* **393**, 280-284.

Petty, K. J. (1993): Metal chelate affinity chromatography. In: Current Protocols in Molecular Biology, *Supplement 24*, 10.11.8-10.11.22.

Pfister, T. and Wimmer, E. (2001): Polypeptide p41 of a norwalk-like virus is a nucleic acid-independent nucleoside triphosphatase. *J. Virol.* **75**, 1.611-1.619.

Porter, A.G. (1993): Picornavirus nonstructural proteins: emerging roles in virus replication and inhibition of host cell functions. *J. Virol.* **67**, 6.917-6.921.

Povey, R. C. and Hale, C. J. (1974): Experimental infections with Feline Caliciviruses (Picornaviruses) in specific-pathogen-free kittens. *J. Comp. Path.* **84**, 245-256.

Prasad, B. V. V.; Rothnagel, R.; Jiang, X. and Estes, M. K. (1994): Three-dimensional structure of the baculoexpressed norwalk virus capsids. *J. Virol.* **68**, 5.117- 5.125.

Prasad, B. V. V.; Hardy, M. E.; Dokland, T.; Bella, J.; Rossmann, M. G. and Estes, M. K. (1999): X-ray crystallographic structure of the Norwalk Virus capsid. *Science* **286**, 287-290.

Ramiro-Ibáñez, F.; Martín-Alonso, J. M.; Palencia, P. G.; Parra, F. and Alonso, C. (1999): Macrophage tropism of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus is associated with vascular pathology. *Virus Res.* **60**, 21-28.

Rigby, P. W. J.; Dieckmann, M.; Thodes, C. and Berg, P. (1977): Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* **113**, 237-251.

Rueckert, R. R. (1996): Picornaviridae: The viruses and their replication. In: Fields Virology; eds. Fields, B. N.; Knipe, D. M. and Howley, P. M.; Lippincott-Raven, Philadelphia, 609-647.

- Rümenapf, T.; Stark, R.; Heimann, M. and Thiel, H.-J. (1998): N-terminal protease of pesti-viruses: Identification of putative catalytic residues by site-directed mutagenesis. . *J. Virol.* **72** (3), 2.544-2.547.
- Ruvoen-Clouet, N.; Ganière, J. P.; André-Fontaine, G.; Blanchard, D. and Le Pendu, J. (2000): Binding of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus to antigens of the ABH histo-blood group family. *J. Virol.* **74** (24), 11.950-11.954.
- Saiki, R. K.; Gelfand, S.; Stoffel, S. et al. (1988): Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Saiki, R. K.; Scharf, S. J.; Faloona, F. et al. (1985): Diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1.350-1.354.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989): Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Oak Ridge, USA.
- Sanger, F.; Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5.463-5.467.
- Schägger, H. and von Jagow, G. (1987): Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1-100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379.
- Schaffer, F. L.; Ehresmann, D. E.; Fretz, M. K. and Soergel, M. E. (1980): A protein, VPg, covalently linked to 36 S calicivirus RNA. *J. Gen. Virol.* **47**, 215-220.
- Sibilia, M.; Boniotti, M. B.; Angoscini, P.; Capucci, L. and Rossi, C. (1995): Two independent pathways of expression lead to self-assembly of the rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein. *J. Virol.* **69**, 5.812-5.815.
- Smith, L. M.; Sanders, J. Z.; Kaiser, R. J.; Hughes, P.; Dodd, C.; Connell, C. R.; Heiner, C.; Kent, S. B. H. and Hood, L. E. (1986): Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* **321**, 674-679.
- Smith, A. W.; Skilling, D. E.; Cherry, N.; Mead, J. H. and Matson, D. O. (1998): Calicivirus emergence from ocean reservoirs: Zoonotic and interspecies movements. *Emerg. Inf. Dis.* **4** (1), 13-20.
- Sosnovtsev, S. V.; Sosnovtseva, S. A. and Green, K. Y. (1998): Cleavage of the Feline Calicivirus capsid precursor is mediated by a virus-encoded proteinase. *J. Virol.* **72** (4), 3.051-3.059.
- Sosnovtseva, S. A.; Sosnovtsev, S. V. and Green, K. Y. (1999): Mapping of the Feline Calicivirus proteinase responsible for autocatalytic processing of the nonstructural polyprotein and identification of a stable proteinase-polymerase precursor protein. *J. Virol.* **73** (8), 6.626-6.633.
- Sosnovtsev, S. and Green, K.Y. (1995): RNA transcripts derived from a cloned full-length copy of the feline calicivirus genome do not require VpG for infectivity. *Virology* **210**, 383-390.

Sosnovtsev, S. V. and Green, K. Y. (2000): Identification and genomic mapping of the ORF3 and VPg proteins in Feline Calicivirus virions. *Virology* **277**, 193-203.

Southern, E. M. (1975): Detection of specific sequence among DNA-fragments separated by gel-electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.

Strebel, K.; Beck, E.; Strohmeier, K. and Schaller, H. (1986): Characterization of foot-and-mouth disease virus gene products with antisera against bacterially synthesized fusion proteins. *J. Virol.* **57**, 983-991.

Takeda, N.; Kuhn, R. J.; Yang, C.-F.; Takegami, T. and Wimmer, E. (1986): Initiation of poliovirus plus-strand RNA synthesis in a membrane complex of infected HeLa cells. *J. Virol.* **60**, 43-53.

Tohya, Y.; Taniguchi, Y.; Takahashi, E.; Utagawa, E.; Takeda, N.; Miyamura, K.; Yamazaki, S. and Mikami, T. (1991): Sequence analysis of the 3'-end of Feline Calicivirus genome. *Virology* **183**, 810-814.

Tohya, Y.; Masuoka, K.; Takahashi, E. and Mikami, T. (1991): Neutralizing epitopes of feline calicivirus. *Arch. Virol.* **117**, 173-181.

Tohya, Y.; Yokoyama, N.; Maeda, K.; Kawaguchi, Y. and Mikami, T. (1997): Mapping of antigenic sites involved in neutralization on the capsid protein of Feline Calicivirus. *J. Gen. Virol.* **78**, 303-305.

Tohya, Y.; Shinchi, H.; Matsuura, Y.; Maeda, K.; Ishiguro, S.; Mochizuki, M. and Sugimura, T. (1999): Analysis of the N-terminal polypeptide of the precursor protein and the ORF3 product of Feline Calicivirus. *J. Vet. Med. Sci.* **61** (9), 1.043-1.047.

Towbin, H.; Staehlin, 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**, 4.350-4.354.

Truyen, U.; Geissler, K. and Hirschberger, J. (1999): Tissue distribution of virus replication in cats experimentally infected with distinct Feline Calicivirus isolates. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* **112** (9), 355-358.

Vázquez, A. L.; Martín Alonso, J. M.; Casais, R.; Boga, J. A. and Parra F. (1998): Expression of enzymatically active Rabbit Hemorrhagic Disease Virus RNA-dependent RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J. Virol.* **72** (4), 2.999-3.004.

Vázquez, A. L.; Martín Alonso, J. M. and Parra F. (2000): Mutation analysis of the GDD sequence motif of a calicivirus RNA-dependent RNA polymerase. *J. Virol.* **74** (8), 3888-3891.

Vogelstein, B. and Gillespie, D. (1979): Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 615-619.

Wei, L.; Huhn, J. S.; Mory, A.; Pathak, H. B.; Sosnovtsev, S. V.; Green, K. Y. and Cameron, C. E. (2001): Proteinase-polymerase precursor as the active form of Feline Calicivirus RNA-dependent RNA polymerase. *J. Virol.* **75** (3), 1.211-1.219.

- Weiland, E.; Ahl, R.; Stark, R.; Weiland, F. and Thiel, H.-J. (1992): A second envelope glyco-protein mediates neutralization of a pestivirus, hog cholera virus. *J. Virol.* **66** (6), 3.677-3.682.
- Wirblich, C.; Meyers, G.; Ohlinger, V. F.; Capucci, L.; Eskens, U.; Haas, B. and Thiel, H.-J. (1994): European brown hare syndrome virus: Relationship to rabbit hemorrhagic disease virus and other caliciviruses. *J. Virol.* **68**, 5.164-5.173.
- Wirblich, C.; Sibilina, M.; Boniotti, M. B.; Rossi, C.; Thiel, H.-J. and Meyers, G. (1995): 3C-like protease of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus: Identification of cleavage sites in the ORF1 polyprotein and analysis of cleavage specificity. *J. Virol.* **69** (11), 7.159-7.168.
- Wirblich, C.; Thiel, H.-J. and Meyers, G. (1996): Genetic map of the calicivirus Rabbit Hemorrhagic Disease Virus as deduced from *in vitro* translation studies. *J. Virol.* **70** (11), 7.974-7.983.
- Wirblich, C. (1995): Die Genomorganisation des Rabbit Hemorrhagic Disease Virus (RHDV). Dissertation. LILIOM Verlag, München.
- Woessner, F.; Rawlings, N. and Barrett, A. J. (1998) Eds.: Handbook of proteolytic enzymes. Academic Press; London: 245. Calicivirus endopeptidases.
- Wyatt, L. S.; Moss, B. and Rozenblatt, S. (1995): Replication-deficient vaccinia virus encoding bacteriophage T7 RNA polymerase for transient gene expression in mammalian cells. *Virology* **210**, 202-205.
- Xu, Z. J. and Chen, W. X. (1989): Viral hemorrhagic disease in rabbits: A review. *Vet. Res. Comm.* **13**, 205-212.

7 Anhang

7.1 Oligonukleotide für Arbeiten mit FCV

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz	Position ¹	Pol ²
FCV 9	ggc tgc agA TTC TTC CCA GAA GTG AAA AGA GCT C	2.820 – 2.795	-
FCV 10	ggc tgc agC AAG TGA CGC CTC GCT ACA TCG TG	2.307 – 2.283	-
FCV 11	GGA TCA CCA CTC CAC CGG GTG TTA TAA ACT GGG	2.650 – 2.619	-
FCV 12	ggg gta cca ata cga ctc act ata GTA AAA GAA ATT TGA GAC AAT G	1 – 22	+
FCV 13	GGT TTA GAG AAG AAT TTC TCC CTC CAT TCC	532 – 502	-
FCV 14	ggg gta ccA TGT CTC AAA CTC TGA GCT TC	20 – 40	+
FCV 15	ggc tgc agC ATT TGC CGG GTG ATA CTG AGT GG	389 – 366	-
FCV 16	ggg gta ccT TGG AAT GGA GGG AGA AAT TC	500 – 520	+
FCV 17	ggc tgc agC GTA ACA TAG AAT CGC TGC TGC C	1.062 – 1.030	-
FCV 18	ggg gta ccG AAT TGG CTA AGA TCT TGC ATG	1.292 – 1.313	+
FCV 19	ggc tgc agG AGT CAA TGT TAA GAA AGG	2.016 – 1.998	-
FCV 20	ggg gta ccG CAC TGC GCA CGT GTT AAC TCC C	2.220 – 2.242	+
FCV 21	ggc tgc agG ATG CGT ACA TTC CAA GAG CAG	2.877 – 2.856	-
FCV 22	ggg gta ccC GAT GAG TGG CGC GAA CAC AAC GCC	2.971 – 2.995	+
FCV 23	ggc tgc agG GTC CTG ATT CCT CAG CAA AGC	3.240 – 3.219	-
FCV 24	ggg gta ccC ACA AGA ATG CAA TTG GAT CTG	3.254 – 3.275	+
FCV 25	ggc tgc agT CTC CCG GGT GAG TTT CAG	3.594 – 3.576	-
FCV 26	ggg gta ccC CAT ATA TTG ATG ACA ACG GGA GGG	3.605 – 3.629	+
FCV 27	ggc tgc agG TGT AGG GCG GTC ATG CCA CTC G	5.290 – 5.268	-
FCV 28	ggg gta ccG GGA GGC ATT CTT CTC CTT TCA CAC C	5.810 – 5.835	+
FCV 29	ggc tgc agG TGT TGG AAA TTT TCT TAT CAC CCC	6.764 – 6.740	-
FCV 31	ggc tgc agT CAA TTC TTA AAC AAA TTT CTA TAT G	7.634 – 7.608	-
FCV 32	ggg gta ccC CAA AGC ATG AAG GCT CCC CC	1.972 – 1.992	+
FCV 33	ggc tgc agT GAT TGG CGG GTA GTT CAT CC	2.436 – 2.416	-
FCV 34	ggg gta ccA TGA ATT CAA TTC TAG GCT TAA TTG	7.326 – 7.350	+
FCV 35	ggc tgc agT CAC CAG GAT GAG TTT CAG TGG	3.593 – 3.575	-

FCV 36	ggg gta ccC TGC CAC ACG AGT ACA CAA TTG G	4.330 – 4.350	+
FCV 37	ggc tgc agC CAA TGC CAA ATT GTA ATT TGG G	5.195 – 5.175	-
FCV 38	ggg gat ccC CAA AGG TCT CCA ACA TCA ATC	1.959 – 1.982	+
FCV 38 A	ggg gta ccC CAA AGG TCT CCA ACA TCA ATC	1.959 – 1.982	+
FCV 39	ggc tgc agG CGG GTA GTT CAT CGA GC	2.461 – 2.443	-
FCV 40	ggg gta ccA TTG GCT GCA CTG CTC ATG T	2.211 – 2.230	+
FCV 42	gct cta gaA GAT CTA TAG ATG TGT TCA ACT CTC	7.051 – 7.069	+
FCV 43	cgg aat tca ata tt (t) ₃₀ CCC TGG GGT TAG GCG CTA GAG CGG C	7.681 – 7.657	-
FCV 43 A	cgg ata tca ata tt (t) ₃₀ CCC TGG GGT TAG GCG CTA GAG CGG C	7.681 – 7.657	-
FCV 44	ggg gta ccA TGT GCT CAA CCT GCG CTA ACG	5.316 – 5.337	+
FCV 45	ggc tgc agA TTA GGG TCC CAA GCT TTT GC	5.685 – 5.665	-
FCV Seq f N-term	ggg gta ccG TAA AAG AAA TTT GAG ACA ATG	1 – 22	+
FCV Seq f 325	GAC GAA TTG TGC CCT GAT GAC C	308 – 329	+
FCV Seq f 620	ggg gat ccT AGA GAA AGC ATG CTA TTG C	602 – 624	+
FCV Seq f 770	GGC TTC CTT CCC AAG CTA ATT GG	~750 – 770	+
FCV Seq f 1.280	ggg gta ccG CGG TTG CTG GAA TTG GC	1.282 – 1.299	+
FCV Seq f 2.530	ggg gta ccA TAT GAC GTG CTT ACT GCC C	2.530 – 2.550	+
FCV Seq f 2.420	ggg gta ccT CAA TGA TAG TGT TAG GCT CGA TG	2.394 – 2.420	+
FCV Seq f 2.840	AAC TCT CGT GCT TAC CGC TCT TGG	~2.830 – 2.850	+
FCV Seq f 3.450	AAG ATC TTA CCT AGT GCT GCT CC	~3.430 – 3.450	+
FCV Seq f 4.025	GAT TGA TCA CCT CTC TGG ATT CG	4.007 – 4.030	+
FCV Seq f 4.540	CGG TAC TTC TCT GAT CGA TCA CC	~4.520 – 4.540	+
FCV Seq f 5.070	ggg gta ccT CAC GTG GGC AGC AGC TTT GG	5.067 – 5.087	+
FCV Seq f 5.640	ggg gta ccA GGT TGC AAA AGC TTG G	5.636 – 5.652	+
FCV Seq f 6.140	ggg gta ccA CCT TAT GTC TGA CAC	6.137 – 6.152	+
FCV Seq f 6.715	AAT ACC AAC TTC AAA GGT ATG	6.690 – 6.712	+
FCV Seq f 7.210	ggg gta ccT CGG TGC CTC CAA CGT TGG	7.205 – 7.223	+
FCV Seq r 400	ctg cag TTT GCA CAT GTC GAT ATT TGC	403 – 383	-
FCV Seq r 850	ggc tgc agA TGA TCA TGG CCA AGT TTA G	825 – 806	-
FCV Seq r 825	ggc tgc agA AAT AGT ATT CTC ATG GTT ATC	851 – 827	-
FCV Seq r 1.360	GAC ATT AAA TTC CTA AGG ATT GGG	~1.380 – 1.360	-

FCV Seq r 2.020	GTT TGA GCT AAA GAG TCA ATG	~2.040 – 2.020	-
FCV Seq r 2.640	CGA CTC AAG GAT CAC CAC TCC	~2.660 – 2.640	-
FCV Seq r 2.695	ggc tgc agT GAC ACC TCC AGC TCT GAT CAC	2.721 – 2.696	-
FCV Seq r 3.800	ggc tgc agT TGG TAT GAT CCT AAT TTC	3.820 – 3.803	-
FCV Seq r 4.420	ggc tgc agT GCC TCA ACA CTA GG	4.429 – 4.415	-
FCV Seq r 4.850	ggc tgc agA CCA TAT GCA GAA AGG	4.864 – 4.849	-
FCV Seq r 5.390	CTA ACA GAA AGA AAC CTA TTG GGG	5.383 – 5.406	-
FCV Seq r 5.770	AGC TGC AGT TGA CAT TTG GGC	5.770 – 5.750	-
FCV Seq r 6.270	ggc tgc agT AGA TGG AAC TTG AAA TC	6.287 – 6.270	-
FCV Seq r 6.780	ggc tgc agT AGT AAT AAA TGC GG	6.783 – 6.769	-
FCV Seq r 7.220	CCA ACG TTG GAG GCA CCG AC	~7.240 – 7.220	-
FCV Seq r C- term	ggc tgc agC CCT GGG GTT AGG CGC TAG AG	7.681 – 7.661	-
FCV T7 ORF2	ggg gta cca ata cga ctc act ata GTG TTC GAA GTT TGA GCA TGT GC	5.297 – 5.319	+
FCV T7 Prom	ggg gta cca ata cga ctc act ata GTA AAA G	1 – 7	+
SP6 FCV	ggg gta cca ttt agg tga cac tat aGT AAA AGA AAT TTG AGA CAA TGT CTC	1 – 26	+
pCite FCV Start	ggg gta ccA TGG CTC AAA CTC TGA GCT TCG TGC TTA AAA CTC ACA ACG	20 – 59	+
FCV r 1.720	ggc tgc agA ATT TGA GGT CAT TAT GAT ATA C	1.748 – 1.723	-
FCV Nde 5314	ggg gta ccA TAT GTG CTC AAC CTG CGC TAA CGT GCT TAA ATA C	5.314 – 5.346	+
FCV Mlu f	cgc gac gcg tTC AAT GAC TAA ATT ATG AAT TC	7.301 – 7.324	+
FCV Mlu r	cgc gac gcg tGA TAG ACC CAT CAT CAG CC	5.706 – 5.685	-
FCV p5 f	ggg gat ccA CAA TGT GAT CAG AGC TGG AGG	2.689 – 2.712	+
FCV p5 rev	ggc tgc agA TTT TGG CCT AAA CCT TGA TGC G	2.897 – 2.872	-

¹ : Positionen bzgl. des FCV-Urbana-Genoms (Sosnovtsev 1995)

² : Orientierung der Oligonukleotide bzgl. dem FCV-Genom

Tabelle 5: Oligonukleotide für die Arbeiten mit FCV

7.2 Oligonukleotide für Arbeiten mit RHDV

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz	Position ¹	Pol ²
RHD42	ACC CTG ACG TGG CCT CAT TCG	2.141 – 2.161	+
RHD43	TGA ACT TGA TTG TAT GGG ATG	2.306 – 2.286	-
RHD44	ACG TGT TCA CCG ACC CCA ACC	2.837 – 2.857	+
RHD45	ACG ACC ACG TTT TGT CTT GCC	3.018 – 2.998	-
RHD46	TGC GAC CAT GGC AGC CCT GGG	2.943 – 2.963	+
RHD47	GTC GTC ACT TCC CAT GGC AGC	3.153 – 3.133	-
RHD48	ggg gat ccG TTG ACG TGT TCA CCG ACC	2.833 – 2.851	+
RHD49	ggc tgc agC TTT CGT TGC AAC TGC ACC	2.980 – 2.962	-
RHD tag1	CAT GGT CAT atg gtg atg gtg atg gtg aca	2.948 (NcoI-site)	-
RHD tag2	CAT Gtg tca cca tca cca tca cca tAT GAC	2.948 (NcoI-site)	+
Label p5 1	CAT GGT cat aca	2.948 (NcoI-site)	-
Label p5 2	CAT Gtg tat gAC	2.948 (NcoI-site)	+
RHDp5Flag1	CAT GGT cat ctt gtc atc gtc gtc ctt gta gtc aca	2.948 (NcoI-site)	-
RHDp5Flag2	CAT Gtg tga cta caa gga cga cga tga caa gat gac	2.948 (NcoI-site)	+
Flag hi 2 fwd	AGC Tga cta caa aga cga tga cga caa gtg tgg	2.988 (HindIII-site)	+
Flag hi 2 rev	AGC Tcc aca ctt gtc gtc atc gtc ttt gta gtc	2.988 (HindIII-site)	-
Flag vo 2 fwd	CGT Gga cta caa aga cga tga cga caa gtg	2.837 (AflIII-site)	+
Flag vo 2 rev	CAC Gca ctt gtc gtc atc gtc ttt gta gtc	2.837 (AflIII-site)	-
p5 His vo fwd	CGT Gca cca tca cca tca cca ttg	2.837 (AflIII-site)	+
p5 His vo rev	CAC Gca atg gtg atg gtg atg gtg	2.837 (AflIII-site)	-
p5 His hi fwd	AGC Tca cca tca cca tca cca tgg	2.988 (HindIII-site)	+
p5 His hi rev	AGC Tcc atg gtg atg gtg atg gtg	2.988 (HindIII-site)	-
pCite p5 fwd	ggt ggc caC CGA CCG CGG TGA CCA AGG CGT TG	2.818 – 2.840	+
pCite p5 rev	ggg aat tct caC TGA AAA GCT TTC GTT GCA AC	2.994 – 2.974	-
p5 Tag U rev	ggg gat ccC TTG CCT TTC ACt caC TGA AAA GC	3.003– 2.980	-
His-ScaI +	ttc acc atc acc atc acc ata		+
His-ScaI -	tat ggt gat ggt gat ggt gaa		-
His-PstI +	cac cat cac cat cac cat ggT GCA	3.105 (PstI-site)	+
His-PstI -	cca tgg tga tgg tga tgg tgT GCA	3.105 (PstI-site)	-

¹ : Position bzgl. des RHDV-Genoms (Meyers 1991)

² : Orientierung der Oligonukleotide bzgl. dem RHDV-Genom

Tabelle 6: Oligonukleotide für die Arbeiten mit RHDV

7.3 Oligonukleotide für Arbeiten in anderen Systemen

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz	Position ¹	Pol ²
Typ III PQ	CGG ATA ACA ATT TCA CAC AG	69 – 88	+
PQ / REV	GTT CTG AGG TCA TTA CTG G	307 – 289	-
M13 rev	GGA AAC AGC TAT GAC CAT G		-
pCITE rev	CAG CTA TGA CCA TGA TTA CG		-
Cite Ums fwd	gga tgc atc ccg ggC CAG TGA ATT GTA ATA CGA CTC ACT ATA GG	3.771 – 0002	+
IRES ohne T7	ggc tgc agc tag ccc ggg acg cgt GCG AAT TAA TTC CGG TTA TTT TCC	3 – 26	+
MCS f pACYC	gat cat gca tgc ggc cgc gag ctc tag agg atc ccg gga att cct cga ggt acc gat atc		+
MCS r pACYC	cta gga tat cgg tac ctc gag gaa ttc ccg gga tcc tct aga gct cgc ggc cgc atg cat		-
pACYC MCSf	GCC TGC AGC ATG AAG CAC TTC ACT GAC	1.523 – 1.547	+
pACYC MCSr	GCC TGC AGC CAA ATT TGA TTC CTT TCA G	3.388 – 3.361	-
pACYC MCS II fwd	act agt gcg gcc gcc cgg gta cct acc tat gat atc tag agg gcc cta g		+
pACYC MCS II rev	cta ggg ccc tct aga tat cat agg tag gta ccc ggg cgg ccg cac tag tca tg		-
AmpR fwd	CAA TAA TAT TGA AAA AGG AAG AGT ATG AGT ATT CAA C		+
AmpR rev	ggc ata tgT TAC CAA TGC TTA ATC AGT GAG GCA CCT ATC TCA G		-
pEX fwd 2	TAC GGG AGG CGA ATG ATC GGT G	~950 – 975	+
pEX rev	CGG GAG CTG CAT GTG TCA GAG	~1.150 – 1.130	-
pBR322 fwd	AAG GGC GAC ACG GAA ATG TTG	~ 4.150	+
Lam PL rev	GTA GGT GAG AGA TCC TCT ACG		-

¹ : Position der Oligonukleotide bzgl. dem jeweiligen Plasmid Genom

² : Orientierung der Oligonukleotide bzgl. dem jeweiligen Plasmid Genom

Tabelle 7: Weitere Oligonukleotide für Klonierungen und Sequenzierungen

7.4 Proteine zur Gewinnung von FCV-Antiseren

	Protein (anti- -Serum)	RHDV-Analog	nt FCV-2024	Größe (etwa) [kD]
ORF1	A	p16	20 - 390	17
	C	p37	1.290 - 2.200	29
	E	p30	2.211 – 2.877	26
	F	p41-Mitte	2.420 – 2.695	11
	G	VPg	2.970 – 3.240	12
	H	Protease	3.254 - 3.580	15
	I	Polymerase	4.260 - 5.200	34
ORF2	J	VP60-Leader	5.316 – 5.687	13
	K	VP60	6.510 – 6.760	10
ORF3	L	VP10	7.326 - 7.634	12

Tab. 8: Charakteristika von bakteriell exprimierten Proteinen, mit denen anti-FCV-Seren erzeugt wurden:

7.5 Veröffentlichte, vollständige FCV-Nukleotidsequenzen

FCV-Stamm	Größe [nt]	Literatur	genbank-acc. #
F9	7.690	Carter et al., 1992	M86379
Urbana	7.683	Sosnovtsev und Green, 1995	L40021
F4	7.681	Oshikamo et al., 1994	D31836
F65	7.681	Neill 1990, 1991; Tohya 1991	AF109465
CFI / 68	7.677		U13992

Tab. 9: Überblick über die veröffentlichten, vollständigen FCV-Sequenzen (vgl. Tab. 4).

7.6 Veröffentlichung

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Meyers, G.; Wirblich, C.; Thiel, H.-J. and Thumfart, J. O. (2000): Rabbit hemorrhagic disease virus: Genome organization and polyprotein processing of a calicivirus studied after transient expression of cDNA constructs. *Virology* **276** (2), 349-363.

Übersicht der Tabellen und Abbildungen (ohne Anhang)

Tabelle 1: RHDV-Spaltstellen-Mutanten

Tabelle 2: RHDV-p5-N-Terminus-Mutanten

Tabelle 3: Überblick für die FCV-Seren

Tabelle 4: FCV-Sequenz-Vergleich

Abbildung 1: Genomorganisation und Polyproteinprozessierung bei RHDV, Stand 1998

Abbildung 2: Vergleich der Genomorganisation von RHDV und PV, Stand 1998

Abbildung 3: Aufbau von pR1228

Abbildung 4 A-C: Etablierung von pR1228

Abbildung 5: RHDV-Spaltstellen-Mutanten, ORF1 vorn

Abbildung 6: RHDV-Spaltstellen-Mutanten, ORF1 zentral

Abbildung 7: RHDV-Spaltstellen-Mutanten, ORF1 hinten

Abbildung 8 A-C: Kinetik der RHDV-Prozessierung

Abbildung 9: Muster der Reaktion des RHDV-p5-Antiserums

Abbildung 10: Analyse der RHDV-p5-N-Terminus-Spaltstellen-Mutanten

Abbildung 11: RHDV: Test auf trans-Protease-Aktivität

Abbildung 12: Schema zum Aufbau des infektiösen FCV-Klons pIK12

Abbildung 13: FCV-RNA-Transfektionstest

Abbildung 14: FCV-Wachstumskurve

Abbildung 15: Nachweis von FCV-Partikeln nach DNA-Transfektion (Kristallviolett-färbung)

Abbildung 16: Nachweis von FCV-Partikeln nach DNA-Transfektion (PO-Färbung)

Abbildung 17: FCV-GFP-Replikon, Test nach Transfektion und 1. Passage

Abbildung 18: Reinigung Protein zur Immunisierung für FCV-Serum C

Abbildung 19: Ausführliche Vorstellung des FCV-Serums A

Abbildung 20: Überblick über die vorhandenen FCV-Antiseren

Abbildung 21: Vorschlag für die FCV-Genomorganisation

Abbildung 22: RHDV-Genomorganisation

Abbildung 23: Vergleich der Genomorganisation von RHDV und PV

Abbildung 24: Vergleich der Genomorganisation von RHDV und FCV

Meine akademischen Lehrer:

An der Universität Stuttgart:

Prof. Dr. Bauer, Prof. Dr. W. Becker, Prof. Dr. W. Eisenmenger, PD Dr. H.-D. Hausen,
Prof. Dr. W. Kaim, Prof. Dr. A. Schmidt, Dr. Schwarz, Prof. Dr. Wagner,
Prof. Dr. J. Weidlein

An der Universität Tübingen:

Prof. Dr. E. Bayer, Prof. Dr. H.-A. Bisswanger, Prof. Dr. P. Bohley, Prof. Dr. V. Braun,
Prof. Dr. U. Breyer-Pfaff, Prof. Dr. K. Eisele, Prof. Dr. K.-U. Fröhlich, Prof. Dr. G. Gauglitz,
Prof. Dr. R. Gebhardt, Prof. Dr. F. Götz, Prof. Dr. J. Guglielmi, Prof. Dr. H. Hagenmaier,
Prof. Dr. B. Hamprecht, Prof. Dr. M. Hanack, Prof. Dr. V. Hoffmann, Prof. Dr. M. Hülskamp,
Prof. Dr. G. Jürgens, Prof. Dr. G. Jung, Prof. Dr. D. Krug, Prof. Dr. E. Lindner,
Prof. Dr. D. Mecke, Prof. Dr. H. Metzner, PD Dr. G. Meyers, Prof. Dr. W. Nakel,
Prof. Dr. H. Ninnemann, Prof. Dr. H. Oberhammer, Prof. Dr. W. Pfeiffer, PD Dr. H. Pommer,
Prof. Dr. K. Poralla, Prof. Dr. H. Probst, Prof. Dr. K. Reutter, Prof. Dr. G. Staudt,
Prof. Dr. H. Stegmann, Prof. Dr. J. Strähle, Prof. Dr. W. Voelter, Prof. Dr. K. Wegmann,
Prof. Dr. J. Werringloer, Prof. Dr. U. Weser

An der Ludwig-Maximilians-Universität München und am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried:

Prof. Dr. G. Gerisch, Prof. Dr. R. Huber, Prof. Dr. W. Neupert, Prof. Dr. A. A. Noegel,
Prof. Dr. D. Oesterhelt, Prof. Dr. R. Schnabel, Dr. H.-J. Schramm, Prof. Dr. J. Sonnenbichler

ISBN 3-00-008782-6