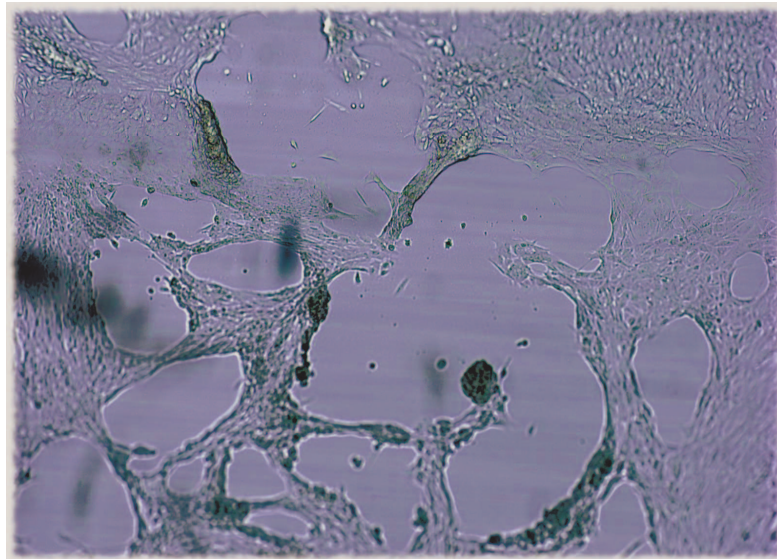


Molekulare Genese der Zytopathogenität des bovinen viralen Diarrhö Virus



2006/05/01 – 2006/05/23

Protokoll:

Carolin Steinl

Stefan Mogk

Betreuung:

PD Dr. Gregor Meyers

Titelbild: Zytopathogener Effekt

Eine Infektion mit zytopathogenen Keimen führt während der Replikation zur Zelllyse. Bei der bovinen viralen Diarrhö ist die Spaltung der Nichtstrukturproteine NS2-3 in NS2 und NS3 notwendig und hinreichend zur Ausbildung eines zpE.

Bildquelle: <http://www.marshfieldclinic.org>

Index

1	Einleitung.....	3
2	Methoden.....	10
2.1	Verdau der DNA	10
2.2	Phenolextraktion.....	10
2.3	In vitro Transkription.....	11
2.4	RNA-Gel.....	11
2.5	Elektroporation.....	12
2.6	Immunfluoreszenzfärbung	13
2.7	T7-Proteinexpression	13
2.8	Proteinreinigung	15
2.9	SDS-PAGE.....	16
2.10	RNA-Extraktion mit TriFast	17
2.11	RT-PCR	17
2.12	Gelextraktion.....	18
2.13	PCR-gestützte Sequenzierung.....	18
2.14	Ethanol-fällung	19
2.15	Virustitration	20
2.16	Wachstumskurve	21
3	Ergebnisse.....	21
3.1	Sind die eingeführten Mutationen ursächlich für das Auftreten des zpE ?	21
3.1.1	Nachweis mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie	21
3.1.2	DNA-Sequenzierung zur Aufklärung der Stabilität eingeführter Mutationen	22
3.2	Auswirkungen auf die Expression der Proteine NS2, NS3 und NS2-3.....	22
3.3	Untersuchung des Wachstumsverhaltens genetisch veränderter BVD-Viren	27
3.3.1	Ermittlung der kulturinfektösen Dosis mittels Virustitration.....	27
3.3.2	Auswertung der Wachstumskurven	27
4	Zusammenfassung.....	28
5	Literatur	30

1 Einleitung

Die Bovine Virusdiarrhö / Mucosal Disease zählt zu den weltweit wirtschaftlich bedeutendsten Erkrankungen des Rindes. Sie wird vom gleichnamigen bovinen viralen Diarrhö Virus (BVDV) verursacht. Die Erreger kommen sowohl in einer nicht-zytopathogenen Form vor, bei der die Körperzellen im Rahmen einer inapparenten Infektion neue Viren ausscheiden, als auch in einer zytopathogenen Form, die mit der Lyse infizierter Zellen einhergeht. Außerdem werden die Pathogene nicht immunologisch bekämpft, wenn der erste Kontakt bereits fötal erfolgte. Klinisch stellen sich entsprechend unterschiedliche Krankheitsbilder dar, die in ihrer Morbidität und Letalität stark differieren¹.

BVDV gehört neben den Erregern der klassischen Schweinepest und des Border Disease Virus des Schafes innerhalb der Gattung der Pestiviren zur Familie der Flaviviren. Diese wiederum bilden zusammen mit den Hepaciviren die Ordnung der Flaviviridae. Tatsächlich stellen Pestiviren die nächsten Verwandten der humanen Hepatitis C-Viren dar und erfahren deshalb besondere Beachtung als Modellsysteme.

Reich:	Viren
Baltimore Group:	((+)ssRNA) IV
Ordnung:	Flaviviridae
Familie:	Flaviviren
Gattung:	Pestiviren
Art:	BVD-Virus

Abbildung 1: Systematik

Die Infektion mit BVDV kann sowohl horizontal als auch vertikal erfolgen. Bei einer horizontalen Ansteckung mit zytopathogenen oder nicht-zytopathogenen Viren entwickelt sich in der Regel ein abgemilderter Krankheitsverlauf („hit and run“ - Strategie), der nach einer normalen Immunantwort vollständig ausheilt. Die betroffenen Tiere tragen Antikörper und sind nach Abklingen der Symptome immun. Deutlich problematischer ist eine vertikale intra-uterine Ansteckung, die auftreten kann wenn das Muttertier im zweiten Drittel der Trächtigkeit mit dem nicht-zytopathogenen BVDV infiziert wird. Die Viren sind plazentagängig und werden auf das Kalb übertragen, das sich in diesem Entwicklungsstadium in einer Phase der Immuntoleranz befindet. Das bedeutet, dass es die Viren nicht als fremd erkennt und entsprechend keine Antikörper bildet. Solche inapparent, aber persistent infizierten (PI) Tiere scheiden lebenslang Viren aus und bilden somit ein Reservoir der Erreger innerhalb der Herde („infect and persist“ – Strategie).

Kommt es nun zur Coinfektion eines solchen PI-Tieres mit dem zytopathogenen Erreger, so wird dieses ebenfalls immunologisch nicht erkannt. Der lytische Replikationszyklus führt

¹ Wikipedia, BVD-MD, Stand Juni 2006

rasch zu einem massiven Krankheitsausbruch mit ausgedehnten Schleimhauterosionen, was als Mucosal Disease bezeichnet wird. Diese Form der BVD hat stets einen letalen Ausgang.

Ein Vaccin gegen BVDV existiert, hat aber selbstverständlich bei PI-Tieren keine Wirkung. Neben den Kosten der vorsorglichen aktiven Immunisierung des gesamten Tierbestandes, ist von einer Impfung insbesondere deshalb abzuraten, da in der Folge keine einfache Unterscheidung zwischen immunisierten und latent infizierten Tieren mehr möglich ist.

Eine Coinfektion eines nicht-zytopathogen (nzp) PI-Tieres mit der zytopathogenen Form des BVD-Virus kann prinzipiell auf zwei Arten erfolgen: Zum einen ist die Überinfektion mit zytopathogenen (zp) Viren möglich, zum anderen können zp Viren direkt durch genetische Veränderungen aus nzp Viren hervorgehen. Insbesondere der Übergang der nzp in die zp Form, dessen Auftreten mitunter erst nach vielen Jahren erfolgt, war in jüngster Vergangenheit Gegenstand biochemischer Forschung ².

BVDV ist ein von einer Lipidmembran umhülltes Virus, dessen ikosaedrisches Kapsid eine einzelsträngige, 12.3kb große RNA positiver Polarität umschließt. Der sense - Strang enthält einen langen offenen Leserahmen, der für etwa 4000 Aminosäuren kodiert. Eine interne Ribosomenbindungsstelle (IRES) markiert dabei den Start der Translation am 5'-RNA-Ende. Die posttranslationale Prozessierung wird sowohl durch Wirtszell-, als auch durch Viruscodierte Proteasen bewerkstelligt. Im folgenden ist das Genom der Pestiviren schematisch dargestellt:

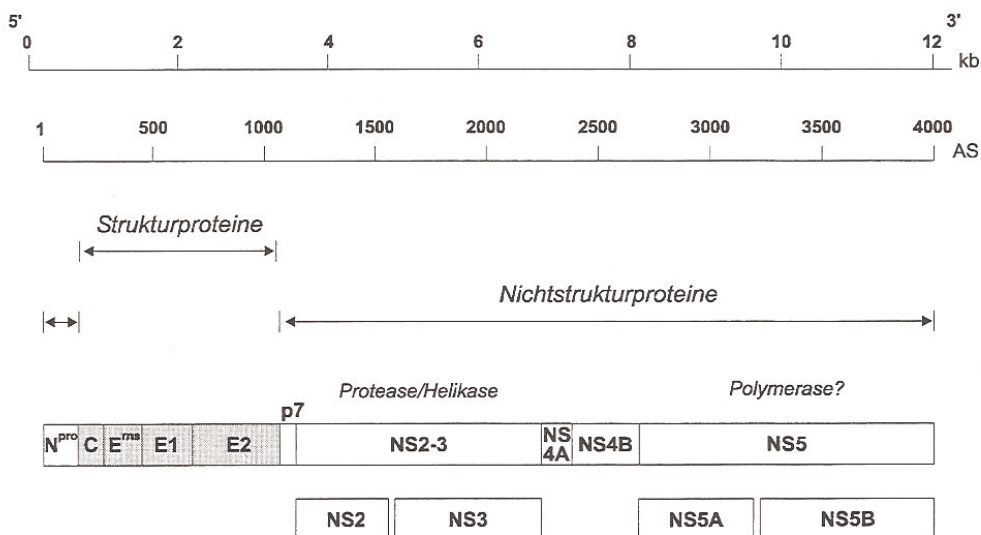


Abbildung 2: Genom der Pestiviren

² Meyers, 1999, Mol. Grundlagen d. Zytopath. v. Pestiviren

Am N-Terminus des Translationsproduktes befindet sich die Protease N^{pro}, die sich autokatalytisch abspaltet. Die darauf folgenden Strukturproteine werden mit Hilfe einer Signalsequenz in das raue endoplasmatische Retikulum adressiert, wo C (Kapsid), E, E1 und E2 durch zelluläre Proteasen abgespalten werden. Die Nichtstrukturproteine NS2-3 werden unterschiedlich exprimiert, je nachdem ob es sich bei den Viren um die zp oder nzp Form handelt ! Während bei nzp Viren das NS2-3 nicht weiter prozessiert wird, bewerkstelligen zp Viren diese Spaltung in NS-2 und NS-3 durch verschiedene Mechanismen. NS3 besitzt NTPase-, Helikase- und Proteaseaktivität und kann mit Hilfe seines Cofaktors NS4A die verbleibenden Nichtstrukturproteine abspalten. NS5B stellt vermutlich die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase dar.

Aus Tieren, bei denen ein Ausbruch von Mucosal Disease festgestellt wurde, konnten stets nzp und zp Viren isoliert werden. Die gemeinsam auftretenden Erreger wiesen dabei meist einen sehr hohen Verwandtschaftsgrad auf. Dies spricht eindeutig für eine evolutive Entwicklung, bei der nzp Viren im Wirt die Fähigkeit erlangen, zytopathogen zu werden. Insbesondere vor dem Hintergrund, dass sich auch Viren einer Art in freier Wildbahn auf Grund ihrer enormen Mutationsrate immer deutlich in ihrem Genom voneinander unterscheiden, erscheint eine schlichte Überinfektion von PI-Tieren mit zp Erregern hier nicht möglich.

Der Übergang vom nzp in den zp Typ beruht auf der neu erlernten Fähigkeit, das NS2-3 Protein in seine Untereinheiten zu spalten. Dies kann durch illegitime Rekombination geschehen, bei der für Ubiquitin codierende Gene des Wirts in das Virusgenom inseriert werden. Je nach Komplexität der durchgeführten Rekombination werden verschiedene Klassen unterschieden:

Viren der Klasse 1 (wichtigster Vertreter: „Osloss“) bauen mindestens ein vollständiges Ubiquitinmonomer unmittelbar zwischen die Gene von NS2 und NS3. Werden mehrere Monomere eingeschoben, so kann das erste eventuell auch unvollständig, d.h. aminoterminal verkürzt sein. Eine Duplikation viraler Sequenzen ist ausgeschlossen.

Viren der Klassen 2 und 3 duplizieren zusätzlich virale Sequenzen. Während bei Klasse 2 nur Teile des NS3 Gens und stromabwärts gelegene Sequenzen dupliziert werden, so ist bei Klasse 3 auch NS2 von der Duplikation betroffen.

Viren der Klasse 4 inserieren nur ein 5'-terminal verkürztes Ubiquitingen, das stromauf von weiteren zellulären Sequenzen flankiert wird.

In allen Fällen erfolgt der Einbau zwischen das NS2- und NS3- Gen und endet 3'-terminal stets mit einem Ubiquitingen. Die Translationsprodukte können so durch Ubiquitin-spezifische Proteasen (Ubiquitin-carboxyterminale Hydrolasen, UCH) verdaut werden, wodurch NS3 freigesetzt wird.

Ferner haben sich auch andere, Ubiquitin-unabhängige Methoden entwickelt, die Spaltung zu bewerkstelligen. Hierbei sind z.B. der Einbau von MAP-Genen des Wirts, die für Mikrotubuli-assoziierte Proteine codieren, zu nennen. Auch die Duplikation von viralen Genen, die mit einem open-reading-frame-shift inseriert werden, wurden beobachtet. Ebenso das gleichzeitige Auftreten von mehreren Punktmutationen. Auch Deletionen im Virusgenom können dazu führen, dass eine autoproteolytische Spaltung von NS2-3 möglich wird. In diesem Fall werden die Viren jedoch zu defekten interferierenden (DI) Partikeln, denen essentielle Gene fehlen, und sind in ihrer Proteinsynthese auf die Unterstützung von vollständigen Hilfoviren angewiesen.

Der Mechanismus, nach dem zelluläre Gene in die virale RNA integriert werden, ist die sogenannte illegitime (weil nicht homologe) Rekombination. Da es sich bei BVDV um ein RNA-Virus handelt, muss dieser Vorgang auf Stufe der RNA ablaufen. Es ist vorstellbar, dass die RNA-abhängige RNA Polymerase bei der Replikation vom Matrizenstrang abfällt und unter Mitnahme des bereits neu synthetisierten Teilstranges auf eine zelluläre Matrize überwechselt („Matrizenwechselmodell“). Nach dem Einbau eines zellulären Gens ist dann je nach Viruskategorie mindestens ein weiterer Wechsel zur viralen Matrize notwendig. Im Gegensatz zur homologen Rekombination ist eine Basenpaarung zwischen den verschiedenen Matrizensträngen nicht möglich, oder zumindest auf sehr kurze, zufällig homologe Stellen beschränkt. Als zelluläre Matrize kommt ausschließlich mRNA (mit positiver Polarität) in Frage, so dass ein Umschreiben zu negativer Polarität führt und ein Matrizenwechsel nur während der Synthese des (-) Stranges sinnvoll ist.

Die Tatsache, dass NS2 und NS3 in der Lage sind, einen zpE hervorzurufen, ihnen dies aber in der Kombination als NS2-3 nicht gelingt, lässt sich vermutlich mit der unterschiedlichen Lokalisation der Proteine in der Wirtszelle erklären. Während das hydrophile NS3-Protein vermutlich im Zytoplasma vorkommt, scheint NS2-3 auf Grund seines hydrophoben Charakters membranständig zu sein. Selbst wenn es die Fähigkeit besitzt, die Vorgänge, die für das Auslösen eines zpE notwendig sind, zu katalysieren, befindet es sich dafür einfach im falschen Kompartiment.

Mit den folgenden Versuchen soll die Frage geklärt werden, inwiefern NS2 (hat sowohl Cys-Proteaseaktivität als auch eine Zinkfinger-Struktur), NS3 (Protease für Nichtstruktur-Proteine) und NS2-3 (evtl. nur katalytisch ?) für das Auftreten eines zytopathogenen Effekts notwendig sind.

Hierzu wird eine Reihe von mutierten zytopathogenen BVD-Viren daraufhin untersucht, ob ein zpE auch mit der Mutation auftreten kann. Sollte dies der Fall sein, wird mit Hilfe einer DNA-Sequenzierung kontrolliert, ob die Mutation stabil ist, oder wegen des Selektionsdrucks wieder entfernt wurde.

Die cDNA der jeweiligen Mutanten zeigen in Expressionsstudien, ob NS2-3 in seine Untereinheiten gespalten wird. Zuletzt lässt sich mit der Aufnahme von Wachstumskurven ermitteln, wie stark die Viren durch die eingeführten Mutationen in ihrer Replikation benachteiligt sind.

Tabelle1: Übersicht der im Praktikum verwendeten Mutanten

Nr.	Plasmid	Mutation	Auswirkung auf	Erkenntnisse aus der Literatur
1	1748 A	C1500 → S	NS2-Zn-bindende-Domäne	20% Protease Aktivität
2	1749 D	C1512 → S	NS2-Protease-A.	26 % Protease A.
3	1741 A	C1487 → S	NS2-Zn-bindende-Domäne	6 % Protease A.
4	1749 E	C1512 → A	NS2-Protease-A.	0% Protease A.
5	1783 J	G1590 → S	Ubiquitin Spaltstelle, NS2-3	Einschränkung der NS2-3 Spaltung
6	1783 K	G1590 → P		
7	1641 S	k. Veränderung: Chimäre		Kontroll-Virus
8	1748 B	C1503 → S	NS2-Zn-bindende-Domäne	37% Protease A.
9	1748 C	C1500 → S + C1503 → S		Keine Angaben für dies Mutante
10	1748 D	C1487 → S		6 % Protease A.
11	1750 A	R1589 → P	Ubiquitin Spaltstelle, NS2-3	Einschränkung der NS2-3 Spaltung
12	1783 L	G1590 → R		
13	1783 M	G1590 → -		
14	1641 S	k. Veränderung: Chimäre		Kontroll-Virus

Tabelle 1 gibt die verwendeten Mutanten des Virus wieder. Die Nummerierung wurde während des gesamten Praktikums beibehalten und wird im weiteren Verlauf auch als Bezeichnung der Mutanten verwendet.

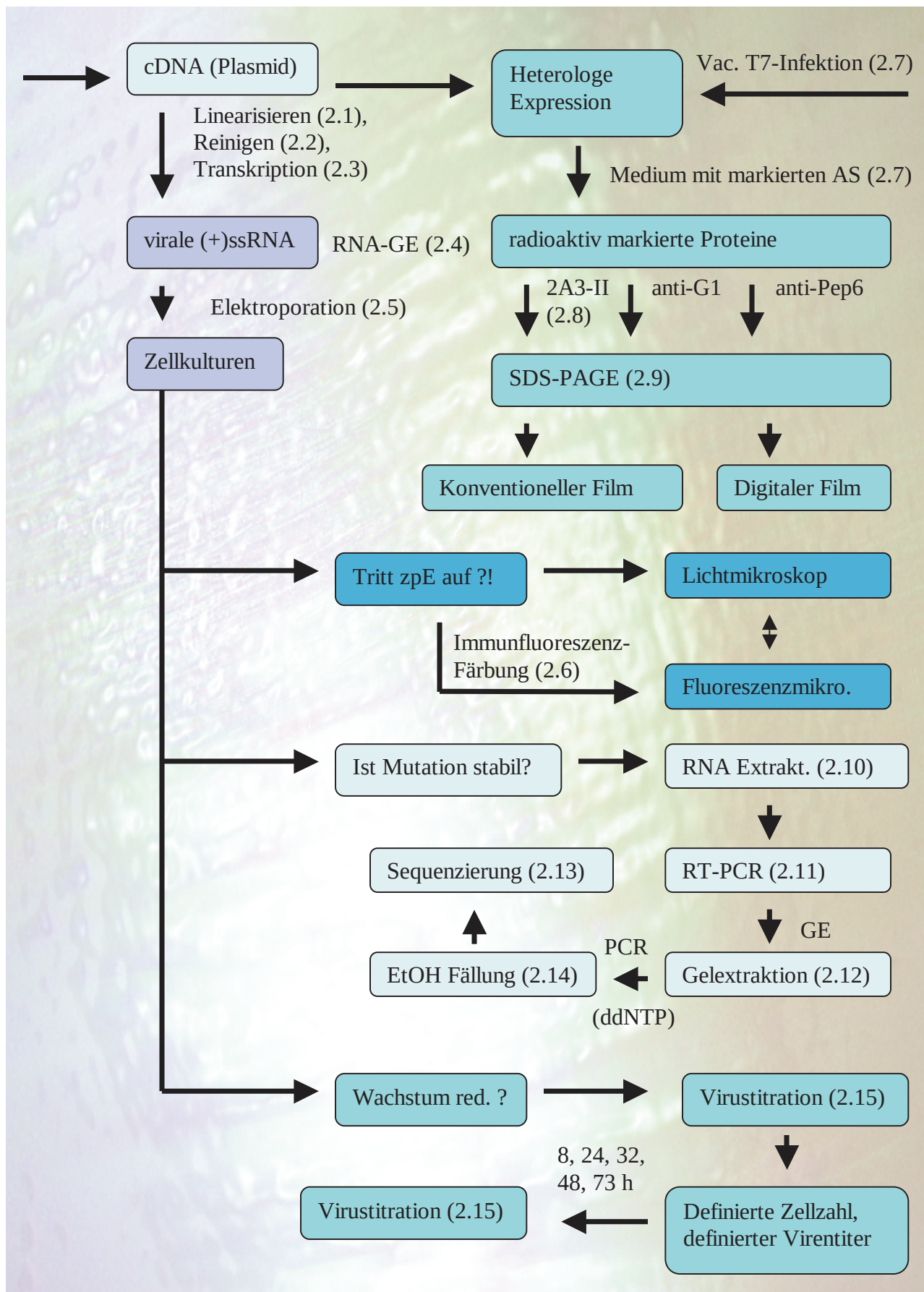


Abbildung 3: Übersicht über alle durchgeführten Experimente

2 Methoden

2.1 Verdau der DNA

Die Plasmide mit den integrierten Konstrukten müssen zur Vorbereitung für die *in vitro* Transkription (2.3) verdaut werden. Hierzu wird in unserem Fall nur ein Restriktionsenzym verwendet.

Ansatz: 100µl Gesamtvolumen

10µl 10X Puffer

x µl DNA

x µl H₂O_{dd}

1,5 µl SmaI

Es werden jeweils 2,5 µg DNA eingesetzt und das H₂O_{dd} Volumen wird demnach berechnet. Nach kurzem mischen und zentrifugieren werden die Proben bei 37°C für ca. 1 Std. inkubiert.

2.2 Phenolextraktion

Die Phenolextraktion wird im Folgenden zweimal durchgeführt. Einmal zur Aufreinigung der verdauten DNA (2.1) und zum zweiten zur Aufreinigung der durch die *in vitro* Transkription entstandene RNA.

Hierzu wird zu einem Ansatz von 100 µl DNA / RNA-Lösung 100µl Phenol gegeben, gevortext und 5min bei voller Drehzahl einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der klare Überstand wird in ein neues Eppendorf Gefäß überführt und mit 100 µl Chloroform gemischt. Nach kurzem Vortexen wird für 1min bei RT zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf Gefäß überführt. Nach versetzen dieser wässrigen Lösung mit 12 µl 2M Kaliumacetat pH 5,6 und 250 µl Ethanol wird die Mischung für 30min auf Trockeneis gelagert und danach 15min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird zweimal mit 80%-igem Ethanol gewaschen und jeweils 15min zentrifugiert. Zum Trocknen des Pellets wird mit Hilfe einer Speed Vac die restliche Flüssigkeit entzogen. Für die *in vitro* Transkription wird das DNA-Pellet nun in 25µl gelöst.

2.3 *In vitro* Transkription

Zu den 25 µl DNA aus (2.3) werden je 25 µl des IvTs-Mix gegeben. Dieser setzt sich wie folgt zusammen:

5 µl 10X Puffer

2 µl 25 mM NTP-Mix

0,8 µl BSA

1 µl T7 Polymerase NEB

1 µl T7 Polymerase Strategy

0,5 µl RNA Guard

14,7 µl depc H₂O

Die gemischten Proben werden für 1 Std. bei 37°C inkubiert.

Zur Aufreinigung der Transkripte werden G50 Säulen vorbereitet. Dafür werden 1ml Spritzen mit ca. 3 Glasfiltern bestückt und mit Sephadex G50 befüllt. Die Spritze sollte nach dem Trocknen zentrifugieren bei 2000 rpm für 2 min. ein Säulenvolumen von 0,7 bis 1 ml haben.

Das Eppendorf Gefäß wird ohne Deckel in das 12ml Röhrchen gesetzt, Spritze wird ins Eppi gestellt und Probe + 50µl depc H₂O auf die Säule gegeben. Nach dem Zentrifugieren wie oben wird die Probe in ein frisches Eppendorf Gefäß mit Deckel pipettiert.

Es wird ein weiteres mal eine Phenolextraktion durchgeführt um die Transkripte aufzureinigen und zu konzentrieren.

2.4 *RNA-Gel*

Die Proben für das RNA Gel werden wie folgt präpariert:

7,5 µl RNA

3 µl 5x Phosphatpuffer

1,8 µl Glyoxal

alles mischen und 35-40 min bei 56°C

+ 3 µl FR (Marker)

Für das Gel werden 1,5 g Agarose mit 140ml H₂O bidest in der Mikrowelle aufgeköcht. Ein Rührfisch wird dazu gegeben und die Lösung unter Rühren abgekühlt.

Wenn sich der Behälter der Lösung handwarm anfühlt wird unter Rühren

+ 21ml Formaldehyd

+ 3ml 50x Phosphatpuffer dazugegeben und zügig das Gel in dem dafür vorbereiteten Behälter gegossen. Nach einer halben Stunde muss der Puffer mit Hilfe einer Pumpe umgepumpt werden.

Zum Färben des Gels wird es ca. 5-10 min. in Acridinorange geschwenkt. Die Konzentration der Färbelösung beträgt etwa 1ml Acridinorange auf 300ml 1x Phosphatpuffer. Entfärbt wird mit Phosphatpuffer 3-mal für je 15 min. Anschließend werden die Gele unter UV-Licht fotografiert. Die Einstellung der Blende beträgt 5.6, belichtet wird etwa für ½ sec.

2.5 Elektroporation

Bei der Elektroporation wird die Zellen einem Spannungsgefälle ausgesetzt, dabei öffnen sich für einen kurzen Moment Poren in der Zellmembran und DNA oder RNA Fragmente können ins innere der Zelle gelangen. Bei einem geringen Prozentsatz werden sogar die Proteine, für die die DNA oder RNA Fragmente codieren, exprimiert.

Vorbereitung der Zellen:

MDBK2-Zellen werden trypsiniert und resuspendiert, mit Medium + FCS aufgefüllt und in Blue-Caps überführt. Nach einmaligem abzentrifugieren für 8 min. bei 1000-1200 rpm wird 1x mit PBS-A gewaschen und wieder abzentrifugiert (s.o.) und in PBS-A resuspendiert, dabei das Zellpellet von 1 gr. Schale in ~ 1,6 ml PBS-A aufgenommen, da ca. 500 µl dieser Zelllösung pro RNA benötigt werden. 2 µl RNA werden in ein Eppendorf Gefäß gegeben und in den gewaschenen Zellen resuspendiert.

Diese Mischungen werden in sterilisierte Küvetten überführt und unmittelbar elektroporiert.

Dazu werden 0,5ml RNA-Zell-Mix in der Küvette in die Kammer gestellt und ein Puls mit folgenden Werten durchgeführt:

980uF Kapazität

180 V

1 sec. = 1000 ms

0 Ω

Die elektroporierten Zellen werden 2-3 min in der Küvette stehen gelassen und mit einer sterilen Pasteur-Pipette in Gewebekulturschalen überführt. Die Küvette wird einmal mit BFA

34 (T) + 10% FCS gespült. Die Zellen werden in einem Gesamtvolumen von 6 ml Medium aufgenommen und auf zwei Mini-Schalen verteilt.

Zum Schluss werden die Küvetten zweimal mit 70 % Ethanol gereinigt. Danach sollten sie mit S2-Lösung für 5 Min stehen gelassen werden und im Anschluss mit Leitungswasser und bidest nachgespült werden.

2.6 Immunfluoreszenzfärbung

Bei dieser Methode soll Virusprotein mit Hilfe von fluoreszierenden Antikörpern in infizierten Zellen nachgewiesen werden. Dazu wird der Mediumüberstand abgekippt und die Platten 3x mit PBS-A gewaschen. (24-well-Platte: 1mL, 96-well-Platte: 150uL, Mini: 2mL)

Die Fixierung der Zellen auf der Platte erfolgt für 20 min mit 4% Paraformaldehyd bei 4°C. (24-well-Platte: 200 µl/well, 96-well-Platte: 50µl/well, Mini: 800uL)

Nach zweimaligem Waschen mit PBS-A wird die Zellmembran 5min mit 0,1% Saponin permeabilisiert bei 4 °C. (24-well-Platte: 200µl/well, 96-well-Platte: 50µl/well, Mini: 1ml)

Nach zweimaligem Waschen mit PBS wird mit dem ersten Antikörper inkubiert. CODE 4 detektiert p80 und wird in einer 1:2 Verdünnung in PBS verwendet (24-well-Platte: 150µl, 96-well-Platte: 50µl, Mini: 800µl). Nach 1-2h bei 37°C oder über Nacht im Kühlschrank wird zweimal mit PBS-A gewaschen und mit dem zweiten Antikörper α -Mouse FITC, 1: 100 verdünnt, für 1 h bei 37°C inkubiert (24-well-Platte: 150 µl/ well, 96-well-Platte: 50µl, Mini: 800 µl). Im Anschluss wird noch einmal mit PBS-A gewaschen und die Wells werden trockengelegt. Mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops können nun infizierte Zellen identifiziert werden.

2.7 T7-Proteinexpression

Virusprotein bestimmter Virusmutanten soll in BHK Zellen exprimiert werden und mit Hilfe von Antiseren aus dem Lysat aufgereinigt werden. Dazu werden BHK Zellen mit Vaccinia Viren infiziert um der Zelle die T7 RNA Polymerase zuzuführen. Die verschiedenen Plasmide werden per Lipofektion in die Zelle eingeschleust und exprimiert. Das folgende Protokoll gibt die einzelnen Schritte bis zur „Ernte“ des Proteins wieder.

- 24 h vor dem Versuch BHK-Zellen in Minis aussäen.
- Zellen 1x mit BFA 34-FCS waschen

- Infektion in 1 ml BFA 34-FCS und Vaccinia MV17 T7 (Titer steht auf der Box)
- 1h Inkubation bei 37°C
- In der Inkubationszeit 1.6 - 5.0 µg DNA mit 75 µl BFA 34-FCS mischen
- 10 μ l Superfect dazufügen
- vortexen
- 5-10 min stehen lassen
- währenddessen die Zellen 1x mit je 2 ml PBS waschen
- Den DNA-Mix zusammen mit 600 µl Medium (mit FCS) auf die Zellen geben
- 4 h bei 37°C inkubieren
- Die Zellen 2x mit je 2 ml Markierungsmedium (es fehlen zwei essentielle AS in diesem Medium) waschen
- Die Zellen mit 1 ml Markierungsmedium versetzen
- 1 h bei 37°C hungern lassen
- Die Zellen 1x mit Markierungsmedium waschen
- 17 µl Radiolabelmix (entspricht den markierten AS die im Markierungsmedium nicht enthalten sind) in 500 µl Markierungsmedium auf die Zellen geben
- Zellen 3 - 12 h bei 37°C inkubieren (Radioaktivlabor)

Aufreinigung der Gesamtproteine

- Rotor TLA 45 kaltstellen
- Die Zellen 1x mit PBS waschen
- Minis zur Vorbereitung der Lyse bei -20°C o. -70°C einfrieren
- Eppis mit je 50 µl 10 % SDS vorbereiten
- Die Zellen mit je 500 µl Triton 1 % alt von den Minis spülen
- Die Lysate 10 min bei 95°C denaturieren
- kurz auf Eis abkühlen
- Lysate für ca. 20 s beschallen, um die DNA zu zerkleinern
- Grobe Zellreste bei 5 000 rpm für 5 min entfernen
- Lysate in Fugenröhrchen überführen und austarieren
- Die Proben 60 min bei 45 000 rpm und 4°C (Programm 6) zentrifugieren
- In 4 ml Röhrchen je 2 ml Triton 1 % alt vorlegen und die Proben in diese Röhrchen überführen

- An dieser Stelle können die Counts gemessen werden, dazu 5 µl der Lysate mit 50 µl Aqua bidest und 2 ml Szintillationsflüssigkeit einsetzen

2.8 Proteinreinigung

Bei der Proteinreinigung bindet Staph A die durch Antikörperinteraktion markierten Proteine. Mit Hilfe von variierenden Triton-X-Konzentrationen werden diese markierten Proteine von den restlichen Zellbestandteilen und Proteinen abgetrennt. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte des Protokolls Stichpunktartig aufgeführt.

Benötigte Lösungen:

1. 5 % Triton
2. 100 mM EDTA
3. PMSF
4. Triton 1 % alt
5. Antikörperseren gegen die nachzuweisenden Proteine:
A: 2A3-II
B: αG1
C: αPep6
6. Staph A
7. Saccharose (Sucrose) 25 %
8. Triton neu 1 %
9. Triton neu 0.2 %
10. Triton neu 0.06 % (3 ml Triton 0.2 % & 7 ml Aqua bidest.)

Proteinreinigung:

- von Gesamtproteinproben werden ca. 500-750 μ l eingesetzt
- Proben mit 5 μ l (für Kaninchenserum) Antikörper versetzen: A, B oder C $\rightarrow$ Proben 1-14 mit den AK A-C: insgesamt sind 42 Proben zu verarbeiten.
- 1h bei 37°C inkubieren
- Staph A muss in ausreichender Menge gewaschen vorliegen. Dafür werden 2 eingefrorene 4 ml Röhrchen auf Eppendorf Gefäße aufgeteilt und abzentrifugiert und zweimal mit PBS gewaschen. Zum Schluss wird wieder auf je 4 ml aufgefüllt.
- 1 h bei 4°C inkubieren
- Je 75 μ l gewaschenes Staph A zufügen (kommt auf den jeweiligen „Titer“ an)

- 30 min bei RT inkubieren und 3 - 4 x vortexen
- über Nacht im Kühlschrank inkubieren
- die Proben vortexen
- die Proben mit 500 μ l 25 % Saccharose Unterschichten
- 10 min bei 5 000 rpm zentrifugieren und Überstand absaugen
- Pellet in 700 μ l Triton neu 1% resuspendieren
- 5 min bei 5 000 rpm zentrifugieren und Überstand absaugen
- Pellet in 700 μ l Triton neu 0.2 % resuspendieren
- 5 min bei 5 000 rpm zentrifugieren und Überstand absaugen
- Pellet in 10 μ l Triton neu 0.06 % resuspendieren
- 40 μ l Verdaulösung zufügen
- Präzipitate 3 min bei 95°C erhitzen
- 10 min bei 10 000 rpm zentrifugieren und Überstand in ein neues Eppendorf Gefäß überführen
- 5 μ l mit 50 μ l Aqua bidest. und 2000 μ l Szintillationsflüssigkeit im Counter zählen
- Proben aufs Gel laden (25 μ l) (2.9)

2.9 SDS-PAGE

Die zuvor grob aufgereinigten radioaktiv-markierten Proteine (2.8) werden elektrophoretisch im Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und sowohl digital, als auch auf konventionellem Filmmaterial visualisiert. Das Verfahren, bei dem die Proteine mit Natriumdodecylsulfat denaturiert und negativ geladen werden, wurde erstmals 1970 von Lämmli beschrieben. Vor dem Eintritt in das eigentliche (engmaschige) Trenngel fokussiert ein weitmaschiges Sammelgel die Proteinbanden.

Zur Weiterverarbeitung wird das Gel auf Whatman-Papier aufgezogen und in einer Gel Trocknungsanlage zwei Stunden bei < 64 °C im Vakuum getrocknet. Die Exposition der Filme erfolgt mehrere Tage bei Raumtemperatur, wodurch die radioaktiven Banden sichtbar gemacht werden können.

Während die digitale Aufnahme sich insbesondere durch eine hohe Farbtiefe auszeichnet (d.h. die Intensität der Banden durch Integration verglichen werden kann), dient die konventionelle Belichtung vor allem der einfachen Sichtbarmachung bei hoher Ortsauflösung.

2.10 RNA-Extraktion mit TriFast

Um festzustellen, ob die eingeführten Mutationen im Verlauf der Kultivierung erhalten blieben, bzw. als Folge eines massiven Wachstumsnachteils zurückmutierten, wird eine RNA-Extraktion der infizierten Zellen vorgenommen. Die erhaltene RNA wird im weiteren Verlauf für eine Sequenzierung vorbereitet (2.11, 2.12, 2.14 und 2.13):

Pro 3.5 cm Kulturschale werden die Zellen mit 1ml TriFast (Peqlabs, Erlangen, Deutschland) lysiert und in ein Eppendorf Cup überführt. Anschließend erfolgt nach 5min Inkubation unter Raumtemperatur eine Zugabe von 200 µl Chloroform unter kräftigem Schütteln. Das Gemisch ruht 5min, danach erfolgt bei 12000 g eine Trennung in eine wässrige Phase (RNA), eine Interphase und eine Phenol-Chloroform-Phase.

Die abgenommene wässrige Phase wird mit 500µl Isopropanol versetzt, gemischt und für 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Die präzipitierte RNA wird bei 12000 g abgetrennt (10min @ 4 °C) und zweimal mit 1mL 75% (v/v) Ethanol gewaschen. Der nach der letzten Zentrifugation und Abnahme des Überstandes verbleibende Alkohol wird in der Vakuumzentrifuge ca. 3min abgedampft. Die so gewonnene reine RNA kann in 20µl depc-versetztem aqua bidest. unter kurzem Schütteln bei 55-60°C wieder in Lösung gebracht werden.

2.11 RT-PCR

Die extrahierte RNA (2.10) soll in DNA zurückgeschrieben und mittels Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert werden. Hierzu wurde folgender Reaktionsansatz (Quiagen, Hilden, Deutschland) vorbereitet.

Aqua bidest.	23,7 µl
dNTP-Mix	2,0 µl
Template RNA	0,5 µl
Forward Primer	1,0 µl
Reverse Primer	1,0 µl
Q-Puffer (5x)	10,0 µl
Enzymmix	2,0 µl

Die Proben wurden im PCR-Cycler alternierend bei 94°C denaturiert, bei 52 °C an die Primer hybridisiert und bei 72 °C vervielfältigt. Das exakte Programm wechselt zwischen folgenden Temperaturen:

Reverse Transkription	30 min	50 °C
Inaktivierung der RT	15 min	95 °C
Zyklus	1 min	94 °C
	1 min	52 °C
	2 min	72 °C
Zyklusende	35-fache Wiederholung	
Programmende	10 min	72 °C
Lagerung		4 °C

Zur Kontrolle und leichteren Aufreinigung wird eine Agarose-Gel-Elektrophorese durchgeführt und die DNA aus einer definierten Bande extrahiert (2.12).

2.12 Gelextraktion

Die unter Sichtkontrolle (Fluoreszenz bei Ethidiumbromid-Färbung, 254 nm) ausgeschnittenen Gel-Stücke werden gemäss ihrem Gewicht in Lysispuffer NT1 aufgenommen (2 µl Puffer / mg Gel).

Die Agarose löst sich unter 10min Schütteln bei 50°C auf und wird auf eine NucleoSpin Extract-Säule (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) aufgetragen. Die Silicamembran bindet DNA unter Anwesenheit chaotroper Salze. Nach einem Waschschrift mit 600µl NT3 wird die Säule zweimal mit einer Tischzentrifuge (11000 rpm) trocken zentrifugiert. Die vorgewärmte Säule wird mit 40µl warmem NE-Puffer (70°C) eine Minute inkubiert und unter Zentrifugation eluiert.

2.13 PCR-gestützte Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgt nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger. Im Wesentlichen wird dabei eine Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifizierung der DNA eingesetzt. Der zugegebene dNTP-Mix enthält jedoch zu einem gewissen Prozentsatz 2',3'-Didesoxynucleotide. Nach Einbau eines solchen Nukleotids kann keine Esterbindung mehr geknüpft werden. Statistisch entstehen so nach jeder Base einige Kettenabbrüche. Diese Fragmente können im Folgenden gemäss ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt werden.

Eine Identifikation des jeweils terminalen dd-Nukleotids erfolgt mittels Fluoreszenz-Markierungen, die in ihren Emissionseigenschaften je nach Base verändert sind. Mit anderen Worten können die terminalen Basen über ihre unterschiedliche Farbe erkannt werden. Dieses Verfahren kommt ohne die Verwendung gesundheitsschädlicher Chemikalien aus und kann weitgehend automatisch ausgelesen werden.

Die PCR wird nach folgendem Pipettierschema durchgeführt:

aqua bidest	5.5 µl
DNA	0,5 µl
Primer OSS 4400	1 µl
Puffer	1 µl
Enzymmix	2 µl

Das exakte PCR-Cycler Programm lautet:

Zyklus	10 min	96 °C
	5 min	50 °C
	4 min	60 °C
Zyklusende	25-fache Wiederholung	
Lagerung	4 °C	

Im nächsten Schritt erfolgt eine letzte Reinigung der DNA durch Ethanolpräzipitation (2.14).

2.14 Ethanolfällung

Es werden 1 µl 3M Natriumacetatlösung pH 5 mit 25 µl Ethanol (p.A.) und 10 µl des Sequenzansatzes aus (2.13) versetzt. Nach 5min bei Raumtemperatur wird das Präzipitat mit einer Tischzentrifuge (20 min @ 14000 rpm) sedimentiert, mit 150 µl Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert.

Das Pellet wird 5 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Kurz vor dem Auftragen auf das Sequenzgel werden die Proben in 3µl Ladepuffer aufgenommen und für 2 min auf 90 °C erhitzt.

2.15 Virustitration

Um das Wachstumsverhalten der eingesetzten BVDV-Stämme zu untersuchen wird eine Methode benötigt, die momentanen Virus-Konzentrationen zu bestimmen. Hierzu wird eine Verdünnungsreihe (hier: jeweils um den Faktor 10) ausgehend von je 100µl der Viruspassagen angesetzt und auf jeweils acht Wells einer 96-Well-Platte ausgebracht. Ein Doppelansatz soll dabei statistische Fehler minimieren.

Die Verdünnungen werden sowohl im Licht- als auch im Fluoreszenzmikroskop (2.6) auf das Auftreten eines zytopathogenen Effektes untersucht. Als Wirtszellen kommen permanente Rindernierenzellen vom Typ MDBK-B2 zum Einsatz. Die adhärennten Zellen werden mit 10ml Trypsin gewaschen und anschließend mit 2ml Trypsin von der Kulturschale abgedaut. Nachdem die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt wurden, erfolgt die Inaktivierung des Enzyms durch Zugabe von 4 ml Medium mit fötalem Kälberserum.

Die abgelösten Zellen werden 1:10 mit Erythromycin gefärbt und in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer quantifiziert. Pro Well der 96-Well-Platte werden $1.75 \cdot 10^4$ Zellen ausgebracht. Nach vier bis fünf Tagen im Brutschrank bei 37°C wird ermittelt, welche Virusverdünnung noch zur Infektion ausreicht.

Die kulturinfektiöse Dosis (KID_{50}) der unverdünnten Viruspassage lässt sich mit folgender Formel nach Spearman und Kaerber ermitteln:

$$\log_{10} LD_{50} = -(x_0 - 0.5 d + d * \Sigma (r / n))$$

mit x_0 : $\log_{10}$ des reziproken Wertes der niedrigsten Verdünnung bei der alle Reagenten einen zpE zeigen
 d : $\log_{10}$ des Verdünnungsfaktors (hier: 1)
 n : Zahl der Reagenten, die pro Verdünnung eingesetzt wurden
 r : Anzahl positiver Reagenten (zpE) pro Gruppe

Die Zusammenzählung wird dabei bei der Verdünnungsstufe x_0 begonnen.

2.16 Wachstumskurve

Zur Aufnahme einer Wachstumskurve werden Zellen und Viren in vergleichbaren Konzentrationen auf Gewebekulturschalen (Typ „Mini“, Falcon 25x10mm) kultiviert. Nach 8, 24, 32, 48 und 73 Stunden wird der Virustiter mit Hilfe einer Virustitration (2.15) bestimmt und in seinem Verlauf graphisch dargestellt.

Pro Zeit und Virus werden auf eine Kulturschale 10^6 MDBK-2 Zellen ausgebracht und mit 10^5 Viren infiziert, was einer moi („multiplicity of infection“) von 0.1 entspricht. Der Ansatz wird in Schnappdeckel Cups vorbereitet und 60min bei 37°C inkubiert. Die infizierten Zellen werden abzentrifugiert, in 1ml Medium mit FCS resuspendiert und auf 10ml Medium mit FCS aufgefüllt. Jeweils 2ml der infizierten Zellen werden nun auf die Kulturschalen übertragen. Nach Ablauf der jeweiligen Kultivierungszeit können die Schalen mit Tesafilm zugeklebt werden und bis zur Virustitration bei -70°C eingelagert werden. Hierbei werden die Zellmembranen zerstört, wodurch es zur Freisetzung der replizierten Viren kommt.

3 Ergebnisse

3.1 Sind die eingeführten Mutationen ursächlich für das Auftreten des *zpE* ?

3.1.1 Nachweis mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Bei der Immunfluoreszenz werden spezifisch Virusproteine in fixierten Zellen angefärbt. Dieses Verfahren wurde im Laufe des Praktikums mehrmals mit unterschiedlichen Ergebnissen angewendet.

Bei der Elektroporation wurde eine Charge der duplizierten Ansätze ebenfalls fixiert und mit Antikörpern markiert. Die Auswertung der Proben 1-14 ergab allerdings nur eine unter dem Mikroskop positive Probe, Nr.4. Bei weiterer Beobachtung der Kulturen 1-14 der zweiten Charge war CP bei Nummer 2,4 und 7 zu erkennen. Das bedeutet dass die Kulturen bereits infiziert waren, das Virusprotein durch die Immunfluoreszenz aber nicht erkennbar. Mit diesen drei positiven Proben und einer weiteren infektiösen Probe (Nr.10) aus dem Bestand der Arbeitsgruppe wurden im Folgenden eine Virustitrationen durchgeführt und Wachstumskurven erstellt.

Bei beiden Verfahren war die Immunfluoreszenz sehr hilfreich da diesmal mit Viren infizierte Zellen deutlich an dem grünen Leuchten der markierten Virusproteine im Zytoplasma zu erkennen waren.

3.1.2 DNA-Sequenzierung zur Aufklärung der Stabilität eingeführter Mutationen

Für die Sequenzierung der DNA der Mutanten Nr. 2, 4, 10, und 7 wird im ersten Schritt RNA aus einer infizierten Kultur nach dem TriFast-Protokoll isoliert und mit Hilfe einer reversen Transkriptase in DNA umgeschrieben. Danach folgt die Sequenzierungsreaktion bei der alle Abbruchnucleinsäuren mit einem eigenen Fluoreszenzmarker markiert sind. Diese Marker werden später im Sequenzierungsgel erkannt und in die Sequenz umgeschrieben.

Die Analyse der Sequenzen ergab das der Kontrollvirus Nr. 7 im betrachteten Bereich die Original Sequenz zeigt. Daher konnte diese als Vergleich herangezogen werde für etwaige Alignments. Die Mutationen in Nr.2 und Nr.4 sind ebenfalls erhalten geblieben. Bei Alignments der Sequenzen dieser Mutationen mit der Original Sequenz sind an der entsprechenden Position anstatt eines Cystein-Rests jeweils der Serin- und der Alanin-Rest wieder zu finden. Nur die Mutation in Nr. 10 wurde durch den Virus rückgängig gemacht. Diese Sequenz entspricht im betrachteten Bereich exakt der Sequenz von Nr. 7. Der Cysteinrest der hier zu einem Serin mutiert wurde ist an der Spaltung von NS 2-3 zu NS 2 und NS 3 verantwortlich. Da NS 3 für die Infektiosität des Virus von Bedeutung ist wird diese Mutation vom Virus sehr schnell verändert.

3.2 Auswirkungen auf die Expression der Proteine NS2, NS3 und NS2-3

Die cDNA der BVDV-Mutanten Nr. 1-14 wird benutzt, um mit Hilfe einer T7-Polymerase Proteinexpression (2.7) zu betreiben. Untersucht werden soll, ob sich die Mutationen auf die Spaltung des NS2-3 Proteins in NS2 und NS3 auswirken. Diese Spaltung ist essentiell für die Ausbildung zytopathogener Eigenschaften der Viren.

Die radioaktiv markierten Proteine wurden mit den Antikörpern 2A3-II (gegen NS3), anti-G1 (gegen ein unabhängiges Kontrollprotein) und anti-Pep6 (gegen NS2) immunpräzipitiert (2.8) und mittels SDS-PAGE (2.9) aufgetrennt. Abbildungen 4-6 zeigen die konventionell belichteten Filme, Abbildungen 7-10 die Auswertung einiger Peaks der digitalen Fotoplatten.

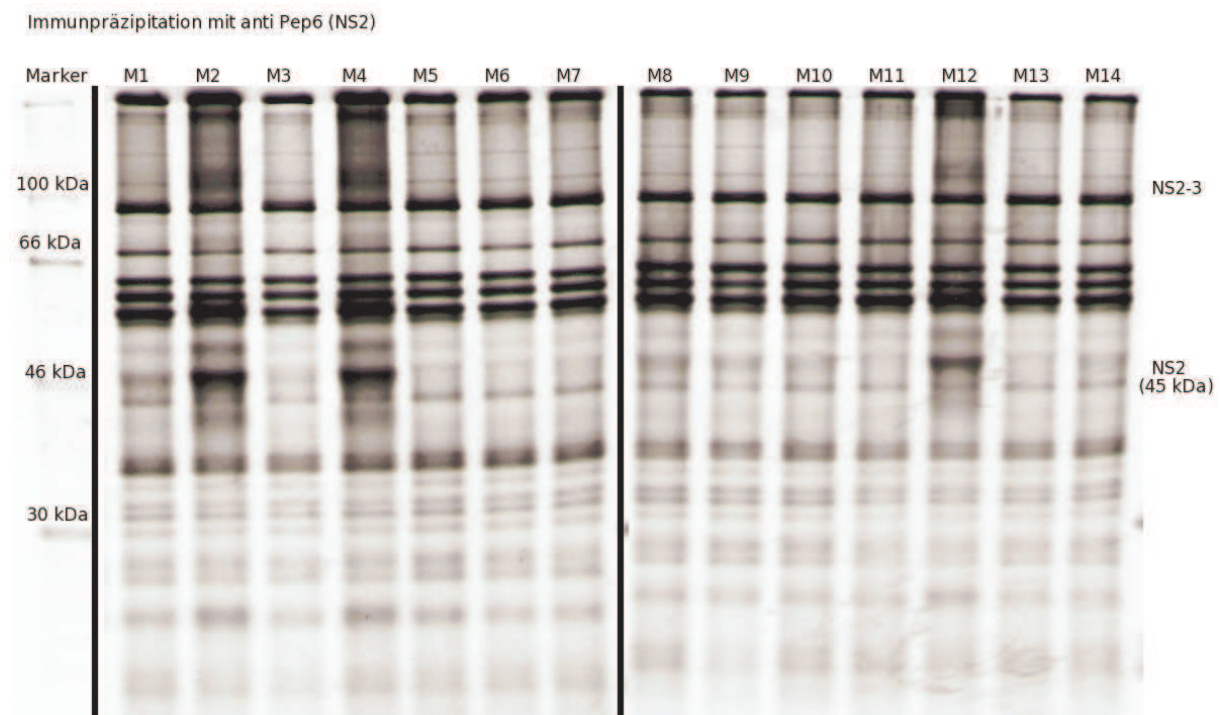


Abbildung 4: Expression der Proteine NS2 (und NS2-3)

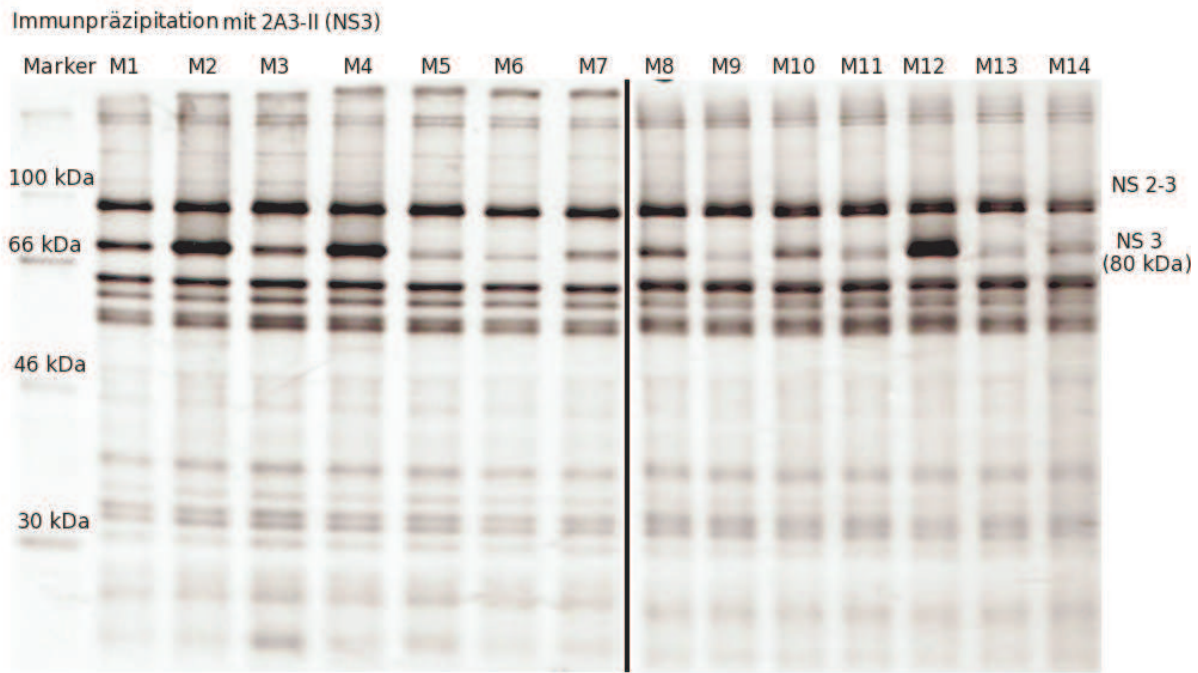


Abbildung 5: Expression der Proteine NS3 (und NS2-3)

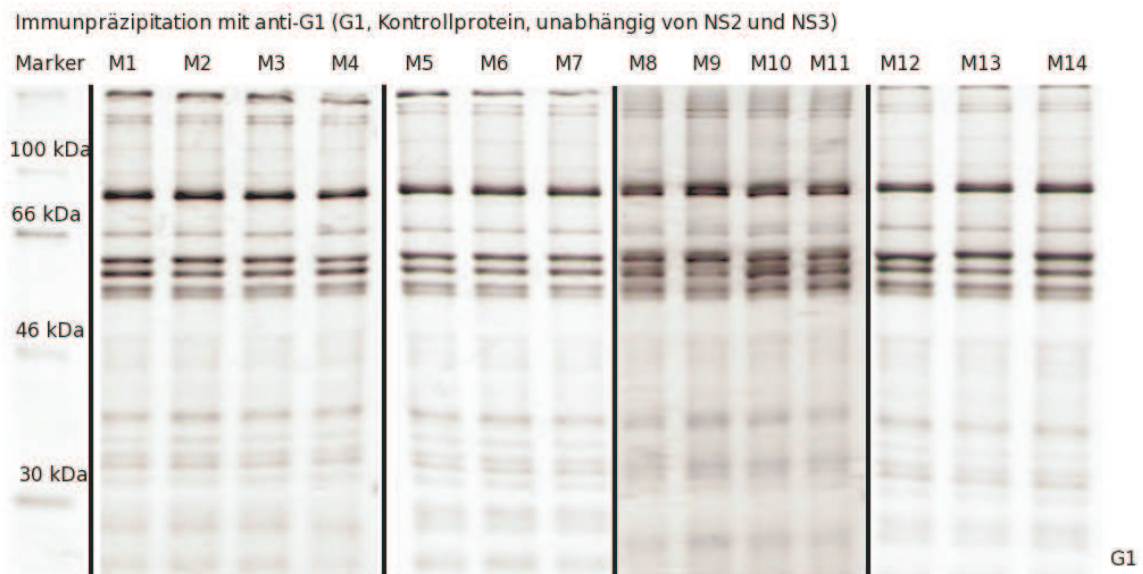


Abbildung 6: Expression des Kontrollproteins G1

Insbesondere bei den Mutanten Nr. 2, 4 und 12 wird NS2-3 in die Proteine NS2 und NS3 prozessiert. Dies entspricht insofern den Erwartungen, als dass die Mutanten 2 und 4 bezüglich ihrer NS-2 Proteaseaktivität verändert wurden und die Spaltstelle selbst unverändert blieb. Der als Kontrolle eingesetzte Wildtyp Nr. 7 zeigt keine eindeutige Prozessierung der besagten Proteine, obwohl NS2 und NS3 klar vorhanden sein müssten.

NS2-3 kann aufgrund seines hohen Molekulargewichts in einem SDS-Gel mit der angewandten Maschenweite nur schlecht aufgelöst werden. Auch in Mutanten in denen die Spaltung vermutlich behindert ist, finden sich keine großen Mengen von NS2-3. Es ist somit schwierig abzuwägen, ob die Spaltung (sofern sie erfolgte) so rasch ablief, dass das Intermediat NS2-3 tatsächlich nicht mehr nachgewiesen werden kann. Diese Frage ist insofern interessant, als dass nicht abschließend bekannt ist, in wie weit NS2-3 für BVDV essentiell ist. Hier könnten weitere Experimente mit einer gezielten Trennung der für NS2 und NS3 codierenden Gene (ggf. mit einer zweiten internen Ribosomenbindungsstelle) durchgeführt werden.

Die Expression oder Fällung der G1-Kontrollen hat in keiner der Mutanten zu einer eindeutigen Bande geführt. Hier ist anzunehmen, dass ein systematischer Fehler bei der Durchführung des Experiments begangen wurde.

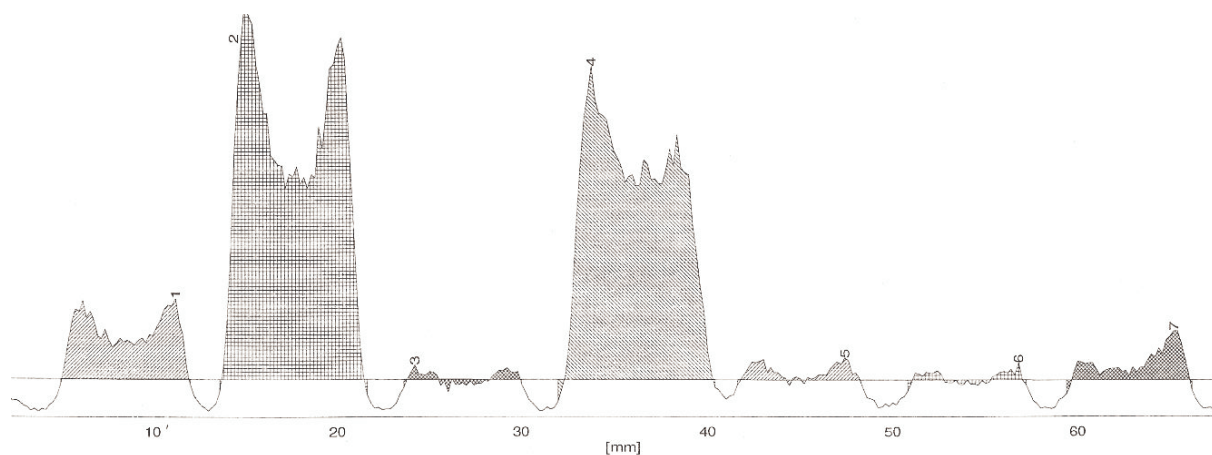


Abbildung 7: Integration über die NS2-Peaks der Mutanten M1-M7 mit anti-Pep6

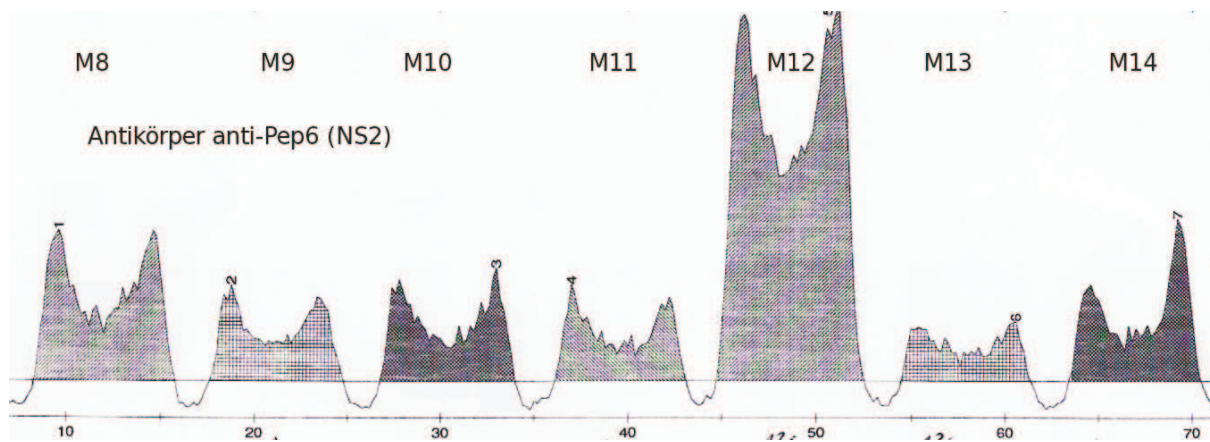


Abbildung 8: Integration über die NS2-Peaks der Mutanten M8-M14 mit anti-Pep6

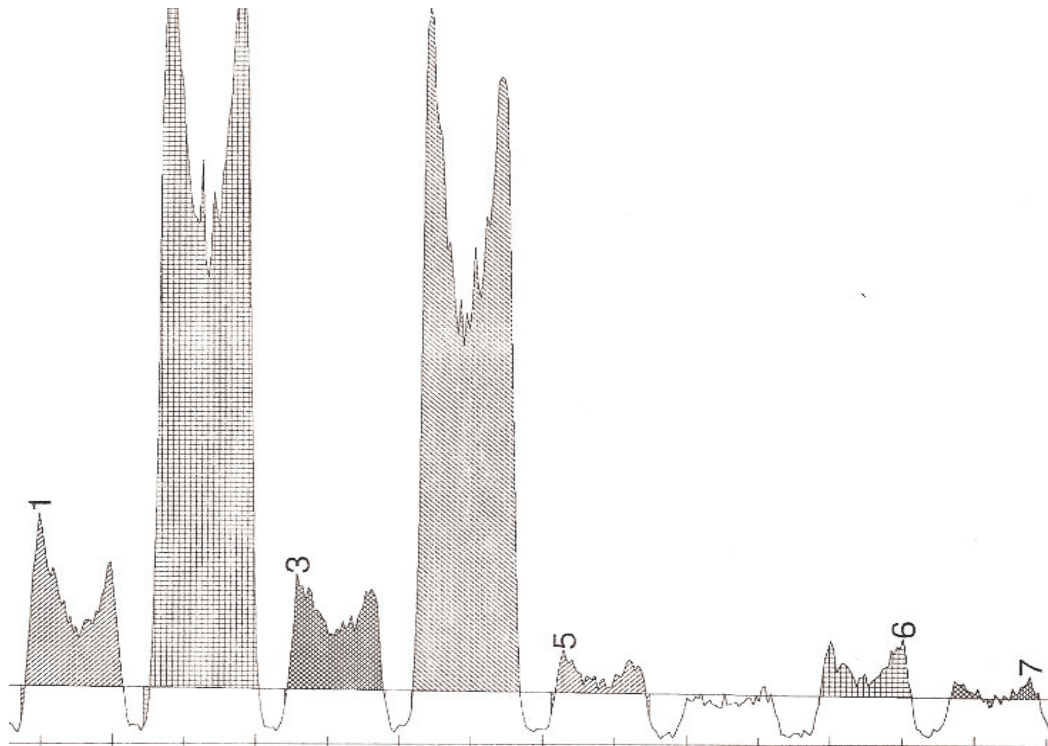


Abbildung 9: Integration über die NS3-Peaks der Mutanten M1-M7 mit 2A3-II

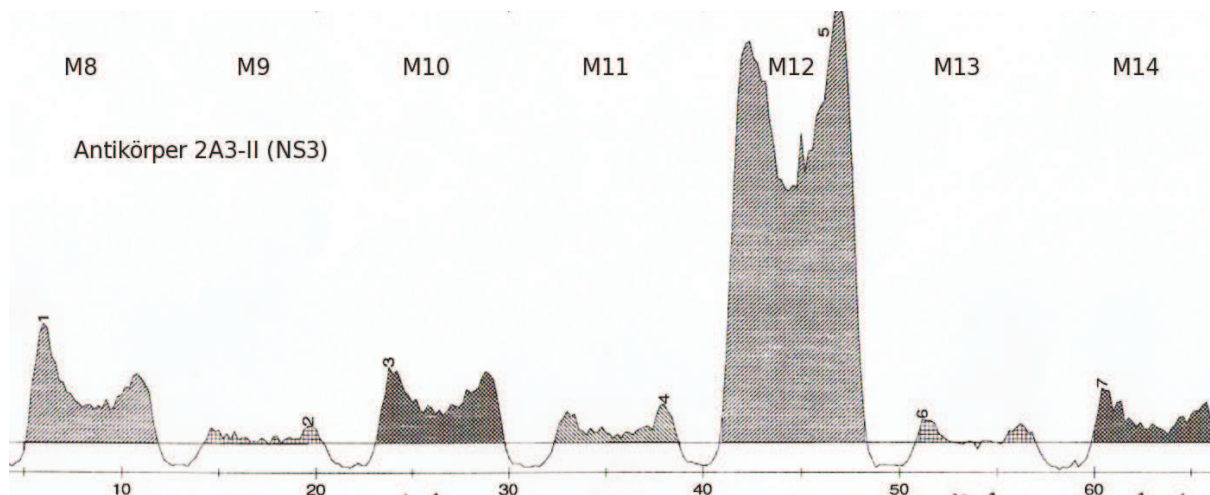


Abbildung 10: Integration über die NS3-Peaks der Mutanten M8-M14 mit 2A3-II

3.3 Untersuchung des Wachstumsverhaltens genetisch veränderter BVD-Viren

3.3.1 Ermittlung der kulturinfektiösen Dosis mittels Virustitration

Bei der Virustitration wird die Immunfluoreszenz angewendet um geringste Infektionsraten in einer Kultur erkennen zu können. In diesem Fall wurde nach einem vereinfachten Verfahren das auf die Methode nach Spearman und Kaerber zurückzuführen ist der Titer der jeweiligen Virusmutanten bestimmt.

Probe Nr. 2: $KID_{50} = 10^{4,5} \text{ ml}^{-1}$

Probe Nr. 4: $KID_{50} = 10^{4,0625} \text{ ml}^{-1}$

Probe Nr. 7: $KID_{50} = 10^{4,875} \text{ ml}^{-1}$

Probe Nr. 10: $KID_{50} = 10^{3,3125} \text{ ml}^{-1}$

3.3.2 Auswertung der Wachstumskurven

Mit Hilfe der in (3.3.1) genannten Virustiter wurden Wachstumskurven (zu Beginn für Nr.2,4,7 $moi=0.1$; für Nr.10 $moi=0.0025$) durchgeführt. Abb. 1 zeigt die Ergebnisse dieser Wachstumskurven.

Virus Nr. 7 stellt die Kontrollkurve da. In diesem Virus wurde im relevanten NS2-3 Bereich nichts verändert. Die Viren Nr. 2 und 4 zeigen Mutationen an derselben Stelle in der Sequenz: einmal von Cystein zu Serin (Nr.2) und bei Nr. 4 von Cystein zu Alanin. In der Literatur wird die Restaktivität der Protease die durch die Mutation von Nr. 2 noch vorhanden ist mit 26% angegeben ⁽³⁾. Ein deutlicher Unterschied zur Kontrollkurve ist nicht zu erkennen. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die eingeschränkte Proteaseaktivität die Infektiosität des Virus nicht merklich vermindert hat. Der Literaturwert der Mutante Nr. 4 besagt für die Protease, dass diese komplett ausfällt und keine Aktivität mehr besitzt. Vergleicht man diese Beobachtung mit der Kurve aus Abb. 1 ist zu erkennen, dass Nr. 4 in den ersten Stunden im Wachstum etwas verlangsamt erscheint, letztendlich aber auf denselben Titer kommt wie der Kontrollvirus. Die Kurve von Virus Nr. 10 ist leider nicht sehr gut vergleichbar mit der Kontrolle da die MOI etwa einem Viertel der anderen entspricht. Das sehr langsame Wachstum im Anfangsbereich könnte man allerdings darauf zurückführen, dass die eingeführte Mutation, die für die Infektion störend wirkt, erst rückgängig gemacht werden musste. Nach Überwindung dieser Schwierigkeit ist auch Nr. 10 in der Lage, auf den End-Titer des Kontrollvirus zu gelangen.

³ Lackner, et al., J.Viro. 78/19, 10765-10775 (2004)

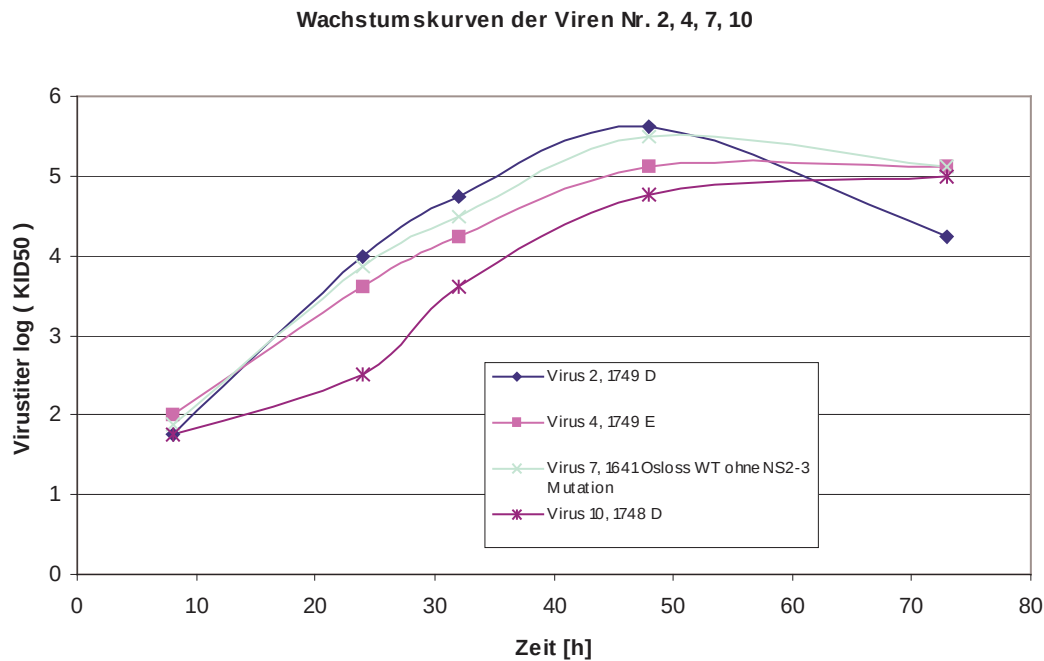


Abbildung 11: Wachstumskurve der Viren Nr. 2, 4, 7 und 10: Für $t=0h$ wurden Nr. 2, 4 und 7 mit einer MOI von 0.01, Nr. 10 mit einer MOI von 0.0025 eingesetzt.

4 Zusammenfassung

Die im Praktikum behandelten Mutanten haben nicht alle den erwarteten Verlauf gezeigt. Drei der 14 untersuchten zeigten nach wie vor zpE, aber es wären mehr zu erwarten gewesen.

Die Cystein-Reste 1500 und 1503 (Nr.1, 8, 9) sind möglicherweise verantwortlich für die Koordination eines Zink-Ions. Eine Mutation an diesen Resten führt zwar zu einer geringen Einschränkung der NS2- Proteaseaktivität, wirkt aber in besonderem Maße störend auf die Spaltung von NS2-3 zu NS2 und NS3. Die Spaltung wird jedoch nicht vollständig verhindert. Daher wird die Infektiosität der Mutanten nicht komplett eingeschränkt und in einer infizierten Kultur sollte diese Zytopathogenität dennoch sichtbar sein. Leider war es uns nicht möglich, diesen Effekt zu beobachten.

Die Mutante C1487S (Nr.3, 10) ist ebenfalls im Bereich der möglicherweise Zn-komplexierenden Cystein-Reste von NS2. Diese Mutation ist für den Virus im höchsten Maße störend. Eine erste Infektion von MDBK-Zellen mit der Mutante Nr. 10 zeigte keinen zpE. Eine Virusvariante mit der selben Mutation aus dem Bestand der Arbeitsgruppe zeigte jedoch zpE, nachdem der Virus selbst diese mutierte Stelle zum ursprünglichen Zustand zurückgeführt hatte. Dies konnte mit Hilfe einer Sequenzierung nachgewiesen werden.

Mutationen an C1512 (Nr.2, 4) zu S oder A beeinflussen die Zytopathogenität nicht. Sie führen lediglich zu einer Einschränkung der NS2-Proteaseaktivität. Um diese Einschränkung in der Wachstumskurve erkennen zu können, müsste diese einige Male wiederholt werden und die Ergebnisse mit der Kontrolle genauestens abgeglichen werden. Dies war jedoch im Rahmen des Praktikums nicht möglich. Es konnte allerdings durch Sequenzierung nachgewiesen werden, dass keine Rückmutation im interessanten Bereich vorliegt.

Die Schnittstelle zwischen NS2 und NS3 erlaubt kaum Mutationen. Wird R1589, letzte AS der NS2 Sequenz, in einen Prolin-Rest mutiert, ist die Spaltung von NS2-3 verhindert. Dies erklärt das Ausbleiben eines zpE bei Nr. 11, da ein Austausch einer polaren AS in eine unpolare für ein aktives Zentrum eine sehr drastische Veränderung darstellt. Ähnlich verhält es sich bei Mutanten an der Position des G1590. Dies ist die erste AS der Sequenz von NS3. Eine Mutation zu S, P oder R (Nr. 6, 12, 13) sollte zu einer Verhinderung der Spaltung von NS2-3 führen. Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung zeigen, dass kein zpE nachzuweisen ist. Somit ist die Infektiosität dieser Mutanten stark vermindert. Bei der Proteinextraktion ist aber vor allem in der Mutante Nr. 12 (G → R) NS3 gut zu erkennen. Um diesem Widerspruch auf den Grund zu gehen müsste dieser Versuch wiederholt werden und zusätzlich eine Sequenzierung der entsprechenden Mutante durchgeführt werden.

1641 WT (Nr.7, 14) entspricht einer Chimäre die im relevanten NS2-3 Bereich keine Mutationen aufweist und wird daher als Kontrolle verwendet. Auch hier zeigten sich keine einheitlichen Ergebnisse. So war es bei Nr. 7 möglich durch eine Elektroporation ein infektiöses Virus in den Zellen zu erzeugen, bei Nr. 14 der zweiten Kontrolle war dies nicht möglich. Dieser Unterschied mag an der grundsätzlich nicht 100%igen Effizienz der Methode liegen.

Die bereits in der Einleitung gestellten Fragen wurden konnten teilweise beantwortet werden. Es hat sich bestätigt, dass die NS2-Proteaseaktivität nicht von größerer Bedeutung für die Infektiosität des Virus ist. Anders sieht es aus in den Bereichen der Zinkfingerstruktur und der Ubiquitin-Schnittstelle. Veränderungen hier können zu einem Verlust der Zytopathogenität führen.

5 Literatur

1. Meyers, G., Molekulare Grundlagen der Zytopathogenität von Pestiviren (1999)
2. Wikipedia, die freie Enzyklopädie, Wikimedia Foundation Inc (Jun 2006)
<http://de.wikipedia.org/wiki/BVD-MD>
http://de.wikipedia.org/wiki/BVD-MD_Virus
<http://de.wikipedia.org/wiki/Virusklassifikation>
3. Lackner, et al., Temporal Modulation of an Autoprotease Is Crucial for Replication and Pathogenicity of an RNA Virus, Journal of Virology 78/19, 10765-10775 (2004)