Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Vorstand: Prof. Dr. Oskar-Rüger Kaaden)
und dem Zentralinstitut des Tiergesundheitsdienstes Bayern e.V., Grub

Angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. Uwe Truyen

Funktionelle Charakterisierung des Vpg-Proteins und der 3D-Polymerase, zwei Nichtstrukturproteine des Felinen Calicivirus

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Judith Staber
aus
Rosenheim

München 2003

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. R. Stolla

Referent: Prof. Dr. U. Truyen

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. H.-J. Gabius

Tag der Promotion: 18. Juli 2003

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

2 Literatur 2

2.1 Caliciviridae *2*

2.2 Das Feline Calicivirus *4*

2.2.1 Morphologie 5

2.2.2 Genomorganisation 6

2.2.3 Replikation 7

2.2.4 Die RNA-abhängige RNA-Polymerase 9

2.2.5 Das virale Genom-gebundene Protein, Vpg (viral protein genome-linked) 10

3 Material und Methoden 13

3.1 Materialien *13*

3.2 Methoden *22*

3.2.1 Zellkulturverfahren 22

3.2.1.1 Kultivierung von CRFK- und Fcwf-Zellen 22

3.2.1.2 Kultivierung von BSR-T7-Zellen 22

3.2.1.3 Kultivierung von Hühnerfibroblasten 23

3.2.1.4 Kryokonservierung von Zellen 23

3.2.2 Virus 23

3.2.2.1 Verwendete Virusisolate 23

3.2.2.2 Viruspropagierung in Zellkultur 23

3.2.2.3 Aufreinigung der Virionen 24

3.2.2.4 Kultivierung des Vaccinia-Virus MVA/T7 24

3.2.2.5 Virustitration 25

3.2.2.6 Isolierung viraler und gesamtzellulärer RNA 26

3.2.3 Transfektion viraler Gene in eukaryotische Zellen 26

3.2.3.1 Transfektion eukaryotischer Zellen mit Fugene6 26

3.2.3.2 MVA/T7-Expressionssystem 27

3.2.4 DNA-Analysen 29

3.2.4.1 Sequenzanalysen 29

3.2.4.2 DNA-Sequenzierung 29

3.2.4.3 Synthetische Oligonukleotide 29

3.2.4.4 Reverse Transkription mit Polymerase-Kettenreaktion 29

3.2.4.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ... 30
3.2.4.6 DNA-Gelelektrophorese ... 31
3.2.4.7 Bestimmung der DNA-Konzentration ... 32
3.2.4.8 Restriktionsenzymverdau von DNA ... 32
3.2.4.9 Aufreinigung kleinerer DNA-Mengen aus enzymatischen Reaktionen ... 33
3.2.4.10 DNA-Ligation ... 33
3.2.4.11 Transformation von Bakterien und Selektion auf Plasmidträger ... 33
3.2.4.12 Isolierung von Plasmid-DNA ... 34
3.2.5 Protein-Analysen ... 35
3.2.5.1 Prokaryotische Proteinexpression ... 35
3.2.5.2 IMAC Proteinreinigung ... 36
3.2.5.3 Dialyse von Proteinen ... 37
3.2.5.4 Bestimmung der Proteinkonzentration ... 37
3.2.5.5 Denaturierende Proteingelelektrophorese (SDS-PAGE) ... 37
3.2.5.6 Elektrotransfer und Immunodetektion von Proteinen (Western Blot) ... 39
3.2.5.7 Indirekte Immunfluoreszenz ... 40
3.2.5.8 Protein-Protein-Co-Immunopräzipitation ... 41
3.2.6 Polyklonale Antikörper ... 44
3.2.6.1 Gewinnung polyklonaler Antikörper durch Immunisierung von Kaninchen ... 44
3.2.6.2 Serumneutralisationstest ... 45

4 Ergebnisse ... 46

4.1 Prokaryotische Expression von Vpg ... 46
4.1.1 Klonierung von Vpg in pQE 60 ... 46
4.1.2 Prokaryotische Proteinexpression ... 47
4.1.3 Proteinaufreinigung ... 47

4.2 Prokaryotische Expression der 3D-Polymerase ... 48
4.2.1 Klonierung der 3D-Polymerase in pQE 30 ... 48
4.2.2 Prokaryotische Proteinexpression ... 48
4.2.3 Proteinaufreinigung ... 49

4.3 Eukaryotische Proteinexpression durch liposomale Transfektion ... 51
4.3.1 Optimierung des MVA/T7 Expressionssystem ... 51
4.3.2 Eukaryotische Expression von Vpg ... 52
4.3.2.1 Klonierung von Vpg in den Vektor pcDNA3.1myc/HisA+ ... 53
4.3.2.2 Klonierung von Vpg in den Vektor pcDNAI/Amp ... 54
4.3.2.3 Proteinexpression ... 55
4.3.3 Eukaryotische Expression der 3D-Polymerase ... 55
4.3.3.1 Klonierung der 3D-Polymerase in den Vektor pcDNA3.1myc/HisA+ ... 56
4.3.3.2 Klonierung der 3D-Polymerase in den Vektor pcDNAI/Amp ... 56
4.3.3.3 Proteinexpression ... 57

4.3.4 Eukaryotische Expression des Kapsidproteins (ORF2) und des ORF3-Proteins ... 57
4.3.4.1 Plasmide und Antikörper ... 57
4.3.4.2 Proteinexpression ... 58

4.4 Herstellung polyklonaler Antikörper ... 59
4.4.1 Polyklonale Antikörper gegen Vpg ... 59
4.4.1.1 Immunisierung der Kaninchen ... 59
4.4.1.2 Gewinnung der Anti-Vpg-Kaninchenseren ... 59
4.4.1.3 Untersuchung der Anti-Vpg-Kaninchenseren ... 59
4.4.2 Polyklonale Antikörper gegen die 3D-Polymerase ... 60
4.4.2.1 Immunisierung der Kaninchen ... 60
4.4.2.2 Gewinnung der Anti-3D-Pol-Antiseren ... 60
4.4.2.3 Untersuchung der Anti-3D-Pol-Antiseren ... 60

4.5 Serumneutralisationstest ... 62
4.5.1 Serumneutralisationstest mit Anti-Vpg-Antiseren ... 62
4.5.2 Serumneutralisationstest mit Anti-3D-Pol-Antiseren ... 63

4.6 Untersuchung der Vpg- und 3D-Polymerase-Expression im Infektionsverlauf ... 64
4.6.1 Zeitlicher Verlauf der Expression von Vpg im Replikationszyklus von FCV ... 64
4.6.1.1 Untersuchung der Vpg-Expression im Western Blot ... 64
4.6.1.2 Untersuchung der Vpg-Expression durch indirekte Immunfluoreszenz ... 64
4.6.2 Zeitlicher Verlauf der Expression der 3D-Polymerase im Replikationszyklus von FCV ... 66
4.6.2.1 Untersuchung der 3D-Pol-Expression im Western Blot ... 66
4.6.2.2 Untersuchung der 3D-Pol-Expression durch indirekte Immunfluoreszenz ... 66

4.7 Untersuchung einer Interaktion zwischen Nichtstruktur- und Strukturproteinen des FCV ... 67
4.7.1 Untersuchung einer Interaktion von Vpg und ORF2 ... 67
4.7.2 Untersuchung einer Interaktion von Vpg und 3D-Polymerase ... 68
4.7.3 Untersuchung einer Interaktion von 3D-Polymerase und ORF2 ... 69
4.7.4 Untersuchung einer Interaktion von ORF3 und Vpg ... 71
4.7.5 Untersuchung einer Interaktion von ORF3 und 3D-Polymerase ... 71

5 Diskussion ... 72

5.1 Aufgabenstellung und Arbeitsplan ... 72

5.2 Herstellung der Hilfsmittel zur Charakterisierung von Vpg und der 3D-Polymerase ... 73
5.2.1 Prokaryotische Expression und Aufreinigung des Vpg-Proteins und der 3D-Polymerase ... 73
5.2.2 Polyklonale Antikörper gegen das Vpg und die 3D-Polymerase ... 73
5.2.3 Eukaryotische Expression rekombinanter Vpg- und 3D-Polymerase-Proteine ... 74

5.3 Charakterisierung von Vpg und der 3D-Polymerase des Felinen Calicivirus ... 75
5.3.1 Untersuchung der Vpg-Expression im Infektionsverlauf ... 75
5.3.2 Untersuchung der 3D-Polymerase-Expression im Infektionsverlauf ... 77

5.3.3 Serumneutralisationstest mit den Anti-Vpg- und Anti-3D-Pol-Kaninchenseren 78
5.3.4 Untersuchung einer Interaktion zwischen FCV-Proteinen 78

5.4 Abschließende Bewertung und Ausblick 80

6 Zusammenfassung 82

7 Literaturverzeichnis 86

8 Anhang 96

8.1 Verwendete Abkürzungen 96

8.2 Abbildungsverzeichnis 99
8.2.1 Abbildungen 99
8.2.2 Tabellen 100

1 Einleitung

Die Familie der *Caliciviridae* umfaßt eine Reihe wichtiger, aber bisher noch wenig charakterisierter human- und tierpathogener Erreger. Zu ihnen zählen unter anderem die humanpathogenen Vertreter Norwalk- und Sapporo-like Viruses, das Vesikulär-Exanthem-Virus der Schweine (VESV), das Rabbit Hemorrhagic Disease Virus (RHDV) und das Feline Calicivirus (FCV), das in dieser Studie näher betrachtet werden soll.

Ätiologisch gilt das FCV, zusammen mit dem Felinen Herpesvirus (FHV-1) und Chlamydia psittaci, als einer der Hauptauslöser des Katzenschnupfenkomplexes bei Feliden. Zur klinischen Symptomatik zählen Rhinitiden, Gingivitiden, Stomatitiden und Arthritiden (Dawson *et al.*, 1994). Die veterinärmedizinische Problematik des FCV liegt vor allem in der erheblichen antigenen Variabilität. Daher befassten sich die meisten Studien mit der Charakterisierung des Kapsidproteins, einschließlich der Erfassung seiner Epitope und Neutralisation antigenetischer Bereiche.

Caliciviren sind unbehüllte, positiv-gerichtete RNA-Viren, deren Genom drei offene Leserahmen umfasst, die für mehrere Nichtstrukturproteine, ein Kapsidprotein und ein ORF3-Protein unbekannter Funktion kodieren.

Die Bedeutung der Nichtstrukturproteine im Replikationszyklus der Caliciviren ist nur zum Teil geklärt. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich daher mit zwei der im ersten offenen Leserahmen kodierten Nichtstrukturproteine des FCV, dem Vpg (viral protein genome-linked) und der RNA-abhängigen RNA-Polymerase.

Die Polymerase ist für die Replikation der viralen RNA und damit für die Vermehrung infektionsfähiger Nachkommenviren essentiell. Das Vpg ist ein viruskodiertes Protein, das am 5‘-Ende der genomischen und subgenomischen RNA kovalent gebunden ist. Zur Funktion des Vpg werden verschiedene Theorien diskutiert. Zum einen könnte das Vpg in der Art eines cap-Analogons den Kontakt zum Ribosom der Wirtszelle herstellen und die Translation initiieren. Zudem könnte das Vpg bei der Enkapsidierung der RNA beteiligt sein, da nur mit Vpg verknüpfte RNA in den Virionen enthalten ist. Weiterhin erscheint es möglich, dass das Vpg als eine Art Primer die Transkription der viralen RNA einleitet. Dabei wird eine Interaktion mit der viruskodierten RNA-Polymerase vermutet.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den beiden letztgenannten Hypothesen. Ziel war es, das Vpg und die RNA-Polymerase funktionell zu charakterisieren und zu untersuchen, ob eine Interaktion zwischen dem Vpg und dem Kapsidprotein, sowie dem Vpg und der RNA-Polymerase des FCV besteht.

2 Literatur

2.1 Caliciviridae

Die Familie der *Caliciviridae* repräsentiert Viren mit einem einzelsträngigen RNA-Genom positiver Polarität. Sie umfaßt sowohl human- als auch wichtige tierpathogene Erreger. Eine neue Einteilung der Familie *Caliciviridae* erfolgte durch das International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) in vier Genera: Lagovirus, Vesivirus, Norovirus (NV) und Sapoviruses (SV). Den vier Genera werden folgende Spezies zugeordnet: das Feline Calicivirus (FCV) und das Vesikulär-Exanthem-Virus des Schweines (VESV) (Genus Vesivirus), das Rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) und das European brown hare syndrome virus (EBHSV) (Genus Lagovirus), das Norwalk-Virus (Genus NV) und das Sapporo-Virus (Genus SV).

Den Namen Calici verdankt die Virusfamilie elektronenoptisch sichtbaren kelchartigen Vertiefungen auf der Oberfläche des Virions (griechisch kalyx: Kelch, Becher, Senke) (Peterson und Studdert, 1970).

Die erste Beschreibung einer durch ein Calicivirus hervorgerufenen Krankheit erfolgte 1932 in den Vereinigten Staaten (Traum, 1934). Es handelte sich um das Vesikulärexanthemvirus des Schweines, welches vesikuläre Läsionen verursacht und so klinisch nicht von der Maul- und Klauenseuche zu unterscheiden war. Bis zur Erlassung groß angelegter Eradikationsprogramme 1956 breitete sich das VESV über die gesamte USA aus.

1972 wurde das San Miguel Sea Lion Virus (SMSV) aus verschiedenen Meeressäugern (insbesondere Seehunde und Seelöwen) isoliert, die ein ähnliches Krankheitsbild wie VESV infizierte Schweine aufwiesen. Hohe antigene und genetische Homologien deuteten auf eine enge Verwandtschaft der beiden Viren hin. Tatsächlich konnte retrospektiv ermittelt werden, dass VESV seinen Ursprung im SMSV hatte, da rohes Fleisch von SMSV-infizierten Seehundkadavern Anfang der dreißiger Jahre an Schweine verfüttert worden war (Smith *et al.*, 1973; Prato *et al.*, 1974). Eine Übertragung von Caliciviren aus dem Reservoir Ozean stellt möglicherweise auch heute noch eine Infektionsquelle terrestrischer Wirte, einschließlich des Menschen, dar (Smith *et al.*, 1998).

Ein weiterer Vertreter des Genus Vesivirus ist das Feline Calicivirus. Es wurde im Jahr 1957 isoliert (Fastier, 1957) und zunächst als felines Picornavirus der Familie *Picornaviridae*, wie auch das VESV, zugeordnet (Wildy, 1971). Das FCV zählt zu den Auslösern des

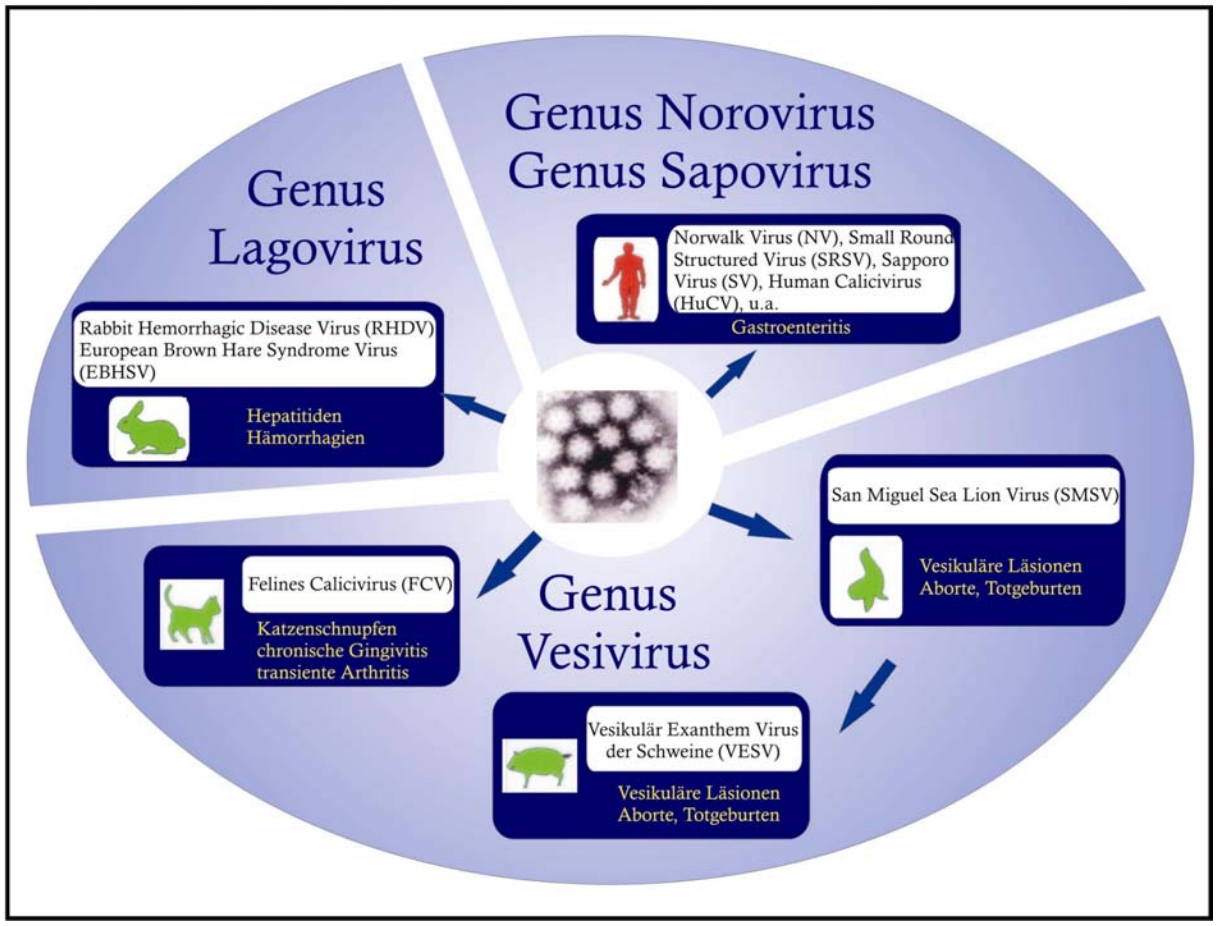
Katzenschnupfenkomplexes und weist in der Katzenpopulation eine hohe Inzidenz auf. Untersuchungen weisen darauf hin, dass sowohl das FCV als auch das antigenetisch verwandte Canine Calicivirus (CaCV) für Durchfallerkrankungen bei Hunden und Katzen verantwortlich sein könnte (Mochizuki, 1991; Evermann *et al.*, 1985).

Das Rabbit Hemorrhagic Disease-Virus (RHDV) wurde 1984 erstmals in China beschrieben (Liu *et al.*, 1984). Anders als andere Caliciviren verursacht RHDV eine schwere generalisierte Erkrankung bei Kaninchen, gekennzeichnet durch Lebernekrose und disseminierter intravaskulärer Koagulation (Ueda *et al.*, 1992). Wegen seiner hohen Virulenz sollte RHDV 1995 im Rahmen einer Studie auf Wardang Island, einer Insel vor der Südküste Australiens, als Rodentizid getestet werden. Das Virus geriet jedoch außer Kontrolle, verbreitete sich innerhalb weniger Monate über den gesamten australischen Kontinent und tötete 80% der Kaninchenbestände (Holden, 1995; Robinson und Westbury, 1997). Das European brown hare syndrome virus (EBHSV) ist genetisch sehr eng mit dem RHDV verwandt (Wirblich *et al.*,1994) und verursacht eine Erkrankung ähnlicher Symptomatik bei Lagomorpha.

Die humanpathogenen Vertreter der Familie *Caliciviridae* sind in den Genera Norovirus und Sapovirus zusammengefaßt. Die Spezies Norwalk virus (NV), Small round structured viruses (SRSV), Sapporo virus (SV), Human Calicivirus (HuCV), Southampton virus (SHV) sowie andere humanpathogene Caliciviren verursachen vor allem bei Kindern, älteren Menschen und unter ungünstigen Hygienebedingungen akute Magen- und Darmerkrankungen, die mit Fieber, Übelkeit und Erbrechen einhergehen (Madeley und Cosgrove, 1976).

Es ist von besonderer Bedeutung, dass bis jetzt noch kein Zellkultursystem für humane Caliciviren und für die Mitglieder des Genus Lagovirus besteht. Untersuchungen an tierpathogenen Caliciviren (v.a. FCV) stellen somit häufig ein ideales Modellsystem für Replikationsstudien der Caliciviren dar. Ein bedeutender Fortschritt wurde mit der Herstellung infektiöser cDNA-Klone von FCV erreicht (Sosnovtsev und Green, 1995; Thumfart und Meyers, 2002). Dadurch wird das Genom der Viren für Mutationen zugänglich, die molekularbiologische Studien erheblich vereinfachen.

Abbildung1: Systematik der Caliciviren



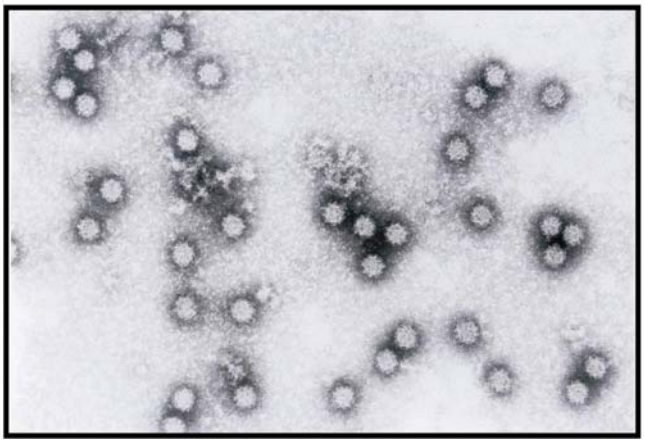
2.2 Das Feline Calicivirus

Erstmalig wurde das Feline Calicivirus 1957 von Fastier isoliert (Fastier, 1957). Damals wurde das FCV, wie auch das VESV, in die Familie der *Picornaviridae* eingeordnet. Calici- und Picornaviren haben neben der morphologischen Größe zunächst auch genetische Gemeinsamkeiten. So besitzen beide eine nicht kodierende Sequenz am 5‘- und am 3‘-Ende. Der erste offene Leserahmen kodiert als polycistronisches Gen für die Nichtstrukturproteine (Neill, 1990) und es bestehen Sequenzhomologien zwischen dem Kapsidprotein der Caliciviren und dem Strukturprotein VP4 der Picornaviren (Neill, 1992). Durch genauere Untersuchungen konnten später jedoch elektronenoptische, physikochemische und genetische Unterschiede festgestellt werden, die eine neue Klassifizierung notwendig machten. Die neuen Viren hatten eine ihnen eigene Morphologie, besaßen keine methylierte Cap-Struktur am 5‘-Ende und das Strukturprotein lag, im Gegensatz zu den Picornaviren, am 3‘-Ende des Genoms (Meyers *et al.*, 1991a). Das FCV wurde deshalb in die neu geschaffene Familie *Caliciviridae* eingeordnet.

2.2.1 Morphologie

Caliciviren sind unbehüllte Viren mit einem Durchmesser von 35-40 nm. Das ikosaedrische Kapsid weist 32 kelchartige Vertiefungen auf, die elektronenoptisch nachweisbar (Peterson und Studdert, 1970) sind und für die Namengebung maßgeblich waren. Diese Vertiefungen sind zwar ein charakteristisches, jedoch nicht bei allen Vertretern deutlich ausgeprägtes Merkmal (Clarke und Lambden, 1997). Das Virion besteht aus 180 Kopien eines einzigen Strukturproteins, dem Kapsidprotein, die zu 90 Homodimeren assoziieren. Das Viruskapsid umfaßt die genomische RNA (Prasad *et al.*, 1994). Das RHDV- und das FCV-Virion schließt zusätzlich eine subgenomische RNA mit ein (Meyers *et al.*, 1991b). *In vitro* bilden verschiedene Vertreter der Caliciviridae auch leere Kapside, die als virusähnliche Partikel (virus-like particle, VLP) bezeichnet werden (Dingle *et al.*,1995; Sibilia *et al.*, 1995). NV bildet *in vivo* VLPs, die aus einem Spaltprodukt des Kapsidproteins aufgebaut ist (Jiang *et al.*, 1992). Die Funktion der Partikel ist bislang unklar (Hardy *et al.*, 1995).
Auch das FCV bildet *in vitro* zwei Partikel unterschiedlicher Dichte (Zhou *et al.*,1994). Vor allem Stämme niedriger Virulenz oder Vaccinierungsstämme produzieren elektronenoptisch weniger dichte Partikel. Neueste Untersuchungen zeigen, daß diese VLPs die subgenomische RNA des FCV enthalten (Neill, 2002).

Abbildung 2 : Elektronenmikroskopische Aufnahme von FCV.
Vergrößerung: 200.000fach.
Färbung: 1,5% Phosphowolframsäure, pH6.5.



.

2.2.2 Genomorganisation

Das Genom der *Caliciviridae* besteht aus einer einzelsträngigen, polyadenylierten RNA positiver Polarität und weist eine Länge von 7.4 bis 7.6 Kilobasen (kb) auf. Am 5‘-Ende befindet sich ein kleines, viruskodiertes Protein, das Vpg (viral protein genome-linked), welches kovalent mit der RNA verknüpft ist (Herbert *et al.*, 1997). Dem Vpg wird entscheidende Bedeutung bei der Translation und/oder Replikation beigemessen. Alle Vertreter der *Caliciviridae* besitzen ein Vpg als charakteristisches Merkmal.

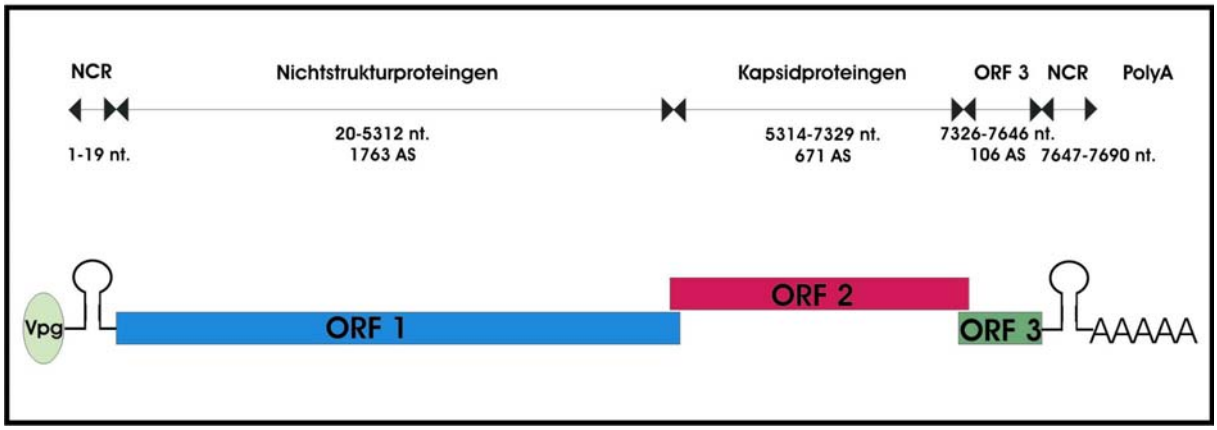
Der 5‘- und der 3‘-Terminus des Genoms ist nicht kodierend (non coding region, NCR) und hochkonserviert. Diesen Bereichen könnte aufgrund einer durch Basenpaarung entstehenden Sekundärstruktur eine Rolle bei der Genregulation zukommen. Es scheint möglich, daß die 5‘-NCR, in Analogie zu Picornaviren, als interne ribosomale Eintrittsstelle (internal ribosome entry site, IRES) dient. Allerdings sind die NCRs der Caliciviren im Vergleich zu Picornaviren (200 bis 400 Nukleotide) eher von geringer Länge (am 5‘-Ende 19, am 3‘-Ende 43 bis 47 Nukleotide).

Das Genom kodiert drei offene Leserahmen (open reading frames, ORF). Am 5‘-Ende befindet sich der erste Leserahmen (Carter *et al.*, 1992a). ORF1 besitzt eine Kodierungskapazität von etwa 70% des gesamten Genoms und kodiert für die Nichtstrukturproteine, die durch eine kotranslationale Prozessierung durch eine viruskodierte Protease aus einem Polyprotein hervorgehen (Komolafe *et al.*, 1980; Carter, 1989; Neill, 1990). Neuste Untersuchungen zeigen insgesamt fünf mögliche Schnittstellen der 3C-ähnlichen Protease, so dass theoretisch sechs verschiedene Proteine autokatalytisch prozessiert werden können (Sosnovtsev *et al.*, 2002). Bekannt sind bislang das 2C-like-Protein, das Vpg, die 3C-like-Protease und die RNA-abhängige RNA-Polymerase (3D-like-Polymerase). Ihre Namen erhielten die Nichtstrukturproteine aufgrund der ähnlich strukturierten Proteine der *Picornaviridae.*

Der zweite Leserahmen befindet sich in der Mitte des Genoms und kodiert für einen Vorläufer des Kapsidproteins. Nach proteolytischer Abspaltung der sogenannten Leader-Sequenz, einem Bereich von 124 Aminosäuren am aminoterminalen Ende des Kapsidvorläuferproteins, durch die viruskodierte 3C-Protease entsteht das reife Kapsid (Neill *et al.*, 1991; Neill, 1992; Sosnovtsev *et al.*, 1998). ORF2 ist gegen den Leserahmen des ORF1 verschoben, so dass zwischen dem 5‘-Terminus des Kapsidproteins und dem 3‘-Terminus der 3D-Polymerase zwei Basen stehen (Carter *et al.*, 1992).

Der am 3‘-Terminus gelegene dritte und kleinste Leserahmen ist ein Charakteristikum der Caliciviren und kodiert für ein stark basisches Protein (ORF3) mit einem isolelektrischer Punkt (IP) von 10 (Herbert *et al.*, 1996). Es wird eine Interaktion des ORF3 mit der RNA und dem Kapsidprotein vermutet, welche eine Enkapsidierung der genomischen RNA ermöglichen soll (Neill *et al.*, 1991). Allerdings besteht auf Aminosäureebene dieses Proteins kaum Homologie zwischen den verschiedenen Vertretern der *Caliciviridae* und auch die Größe variiert erheblich (106-117 Aminosäuren bei FVC und RHDV bis 211-268 Aminosäuren bei NV) (Clarke und Lambden, 2000).

Abbildung 3: Genomstruktur des FCV



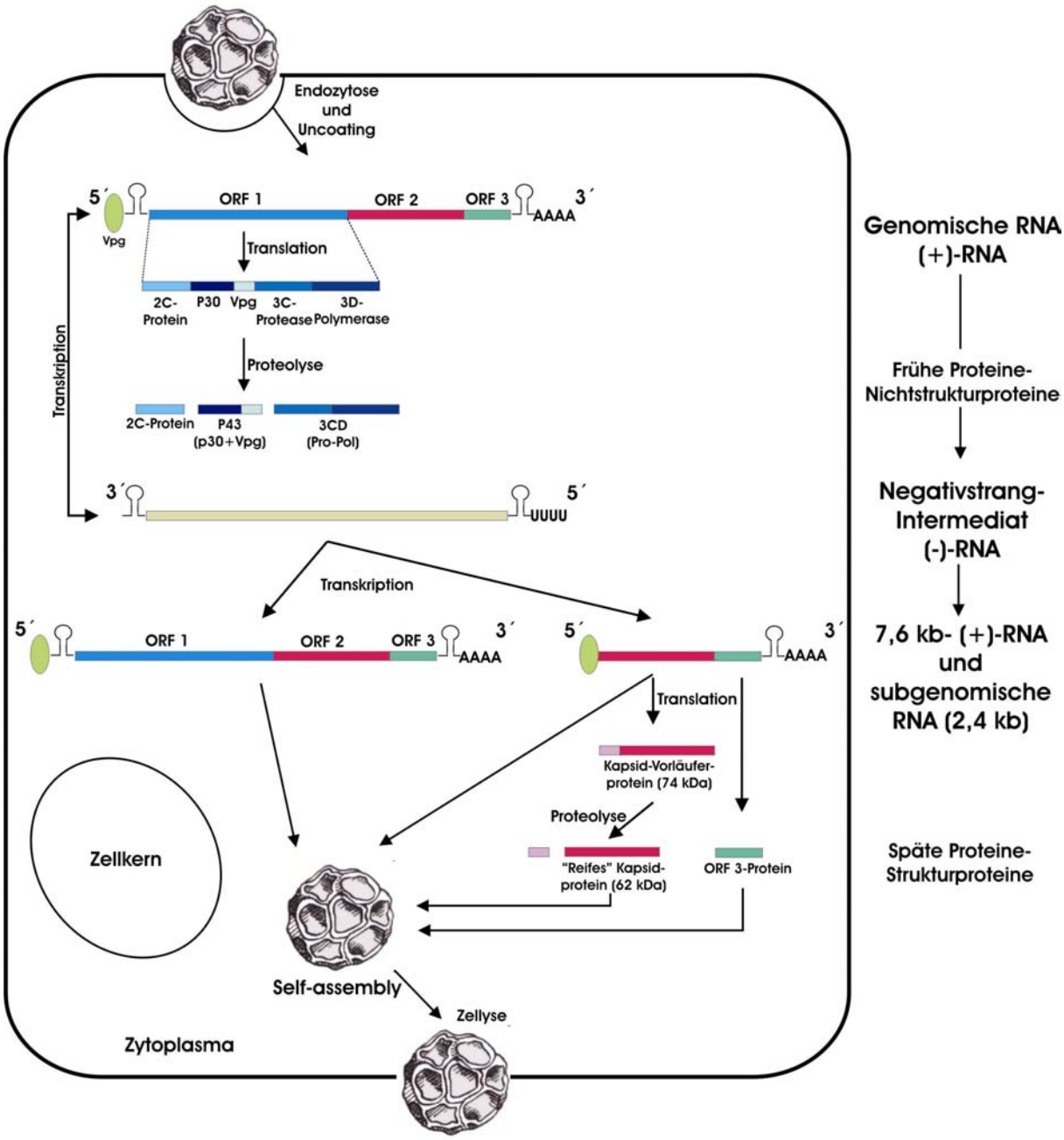
2.2.3 Replikation

Das Feline Calicivirus infiziert *in vivo* wirtsspezifisch Katzen und Großkatzen. *In vitro* repliziert das FCV in primären und permanenten felinen Zelllinien (Crandell, 1973). Die Replikation der Caliciviren findet im Zytoplasma der infizierten Wirtszelle statt. Dabei dringen die Caliciviren wahrscheinlich durch rezeptorvermittelte Endozytose in die Zelle ein. Der Rezeptor selbst ist bislang unbekannt, es scheinen jedoch Glycoproteine bei der Bindung des Virus an die Zelle beteiligt zu sein, da eine Behandlung mit Glykosylasen die Infektiosität erheblich reduziert (Kreutz *et al.*, 1994). Nach Freisetzung der viralen RNA in die infizierte Zelle (uncoating), dient diese wahrscheinlich direkt als mRNA für die Translation der Nichtstrukturproteine. Der genaue Replikationsmechanismus ist noch nicht ganz geklärt. Es scheint aber gesichert, dass sich bei der Translation des ORF1 zunächst ein Polyprotein bildet, das durch autokatalytische Prozessierung der 3C-Protease in die einzelnen Nichtstrukturproteine zerteilt wird, in Analogie zur proteolytischen Kaskade der Picornaviren (Palmenberg, 1990). Nach bisherigen Untersuchungen entstehen so das 2C-Protein, das Vpg,

die 3C-Protease und die 3D-Polymerase (Wirblich *et al.*, 1995). Weitere mögliche Proteine, die durch zusätzliche und für die Replikation essentielle Schnittstellen der 3C-Protease definiert werden, bedürfen noch der genaueren Charakterisierung (Sosnovtsev *et al.*, 2002). Die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase transkribiert die genomische RNA in ein RNA-Intermediat negativer Polarität (Neill und Mengeling, 1988). Das Intermediat dient als Matrize für die Bildung einer genomischen Kopie der FCV-RNA von 7.6 kb und einer subgenomischen RNA mit einer Länge von 2.4 kb. Die subgenomische RNA beinhaltet den zweiten und dritten Leserahmen und ist ein wichtiges Charakteristikum der *Caliciviridae*. Sie dient als mRNA für die Translation der Strukturproteine, wobei eine Hochregulierung der Kapsidproteinexpression durch Strukturen der subgenomischen RNA möglich erscheint (Clarke und Lambden, 2000). Es entsteht ein 75 kDa großer Vorläufer des Kapsidproteins, welcher durch Abspaltung der sogenannten Leader-Sequenz in das reife Kapsidprotein prozessiert wird. Neben dem Kapsidprotein befindet sich der Leserahmen für das ORF3-Genprodukt auf der subgenomischen RNA. Auffällig ist in diesem Zusammenhang ein Leserasterschub von einem Nukleotid zwischen ORF2 und ORF3 (Fujimura und Wickner, 1988).

Das Vpg-Protein heftet sich an das 5‘-Ende der neu gebildeten genomischen und auch der subgenomischen RNA. Der Zusammenbau der Virionen erfolgt selbstständig (self assembly), auch ohne die Anwesenheit einer RNA. Der Verpackungsmechanismus des viralen Genoms in die Partikeln ist noch ungeklärt.

Abbildung 4: Replikationszyklus des FCV



2.2.4 Die RNA-abhängige RNA-Polymerase

Eine RNA-abhängige RNA-Polymerase (RNA-dependent RNA-Polymerase, RdRP) ist ein wichtiges Protein aller positiv-stängiger RNA-Viren. Ihre Aufgabe besteht in der Synthese sowohl einer Negativstrang-RNA als Zwischenprodukt während der Replikation, als auch eines Plusstrang-Genoms als Erbinformation für die Nachkommenviren.

Vergleichende Analysen der Aminosäuresequenz der RdRPs von Viren mit RNA-Genom positiver Polarität zeigten, dass die Polymerase das einzige virale Protein mit konservierten

Motiven dieser Virusklasse ist. Es eignet sich daher für phylogenetische Analysen. Innerhalb der von Koonin durchgeführten Studien, basierend auf einem Vergleich der Aminosäuresequenzen aller positiv-gerichteter RNA-Viren, wurde die RdRP der Caliciviren der Supergruppe I zugeordnet, zu der auch die RdRPs der Picornaviren gehören (Koonin, 1991).

Die 3D-like Polymerase des FCV kodiert am 3‘-Ende des ersten Leserahmens (ORF1) (nt 4277 bis nt 5311) und liegt zwischen der 3C-like Protease und dem Kapsidprotein (ORF2). Die erste Sequenzanalyse der FCV RdRP wurde 1990 zusammen mit den anderen Nichtstrukturproteinen veröffentlicht (Neill, 1990). Spätere Studien zeigten, dass die 3D-Polymerase während der Infektion als stabiles Protease-Polymerase Vorläuferprotein (3CD Pro-Pol) in Zellen akkumuliert (Sosnovtseva *et al.*, 1999).

Weitere Untersuchungen bestätigten die Annahme, dass das Pro-Pol Vorläuferprotein des FCV, im Gegensatz zu Polioviren (Familie *Picornaviridae*) (Harris *et al.*, 1992), die primäre, aktive Form der Polymerase ist. Eine mögliche Erklärung sehen die Autoren in der unterschiedlichen Konformation der Pro-Pol Domäne bei FCV und Poliovirus, da sich eine längere Sequenz zwischen den beiden Proteinen bei FCV befindet. Dadurch können sich beide Domänen unabhängig voneinander falten und ihre Funktion wahrnehmen (Wei *et al.*, 2001). Allerdings existieren auch kürzere Formen des 3CD-Proteins bei Caliciviren (Sosnovtseva *et al.*, 1999), die ebenfalls eine aktive Form der Polymerase darstellen können. Es wird diskutiert, ob die Polymerasen unterschiedlicher Größen auch unterschiedliche Aufgaben erfüllen. So könnte eine Form der Polymerase für die Synthese der genomischen, eine andere für die Synthese der subgenomischen RNA verantwortlich sein. Möglich erscheint auch, dass eine Form für die Initiation der RNA-Synthese, mit Vpg als Primer, die andere zur Elongation verwendet wird. (Wei *et al.*, 2001). Die Möglichkeit, dass Vpg als Primer für die RdRP fungiert, wurde schon für Picornaviren postuliert (Paul *et al.*, 1998).

2.2.5 Das virale Genom-gebundene Protein, Vpg (viral protein genome-linked)

Das Vpg ist ein virales Protein, welches kovalent an das 5‘-Ende des Genoms vieler RNA-Viren gebunden ist. Bekannt sind Vpgs bei Picornaviren, Caliciviren und einigen Pflanzen-RNA-Viren (zum Beispiel Comoviren, Nepoviren, Luteoviren) (Wimmer, 1982). Es handelt sich um kleine (2.5 bis 15 kDa), basische Proteine ohne helicalen Aufbau.

Der erste Nachweis für ein kovalent gebundenes Protein an RNA der Familie *Caliciviridae* gelang 1978 für VESV (Burroughs und Brown, 1978). Spätere Arbeiten zeigten, dass auch

das SMSV (Schaffer *et al.*, 1980), das FCV (Herbert *et al.*, 1997) und die genomische sowie die subgenomische RNA des RHDV (Meyers *et al.*, 1991) ein Vpg am 5‘-Ende des Genoms besitzen.

Das Vpg wird im ersten Leserahmen (ORF1) des FCV-Genoms kodiert (nt 2900 bis nt 3232) und liegt unmittelbar vor der Sequenz der 3C-Protease. Nach proteolytischer Spaltung des Nichtstrukturpolyproteins durch die virale Protease liegt das Vpg entweder in freier Form (ca. 13 bis 14 kDa) vor oder als Vorläuferprotein zusammen mit einem 30 kDa Protein (p30 und Vpg = p43), dessen Funktion noch nicht geklärt ist (Green *et al.*, 2002; Sosnovtsev *et al.*, 2002). Nach der Replikation der Virus-RNA heftet sich das Vpg an die neu gebildete genomische und subgenomische RNA. Die Bindung an die virale RNA scheint über eine Phosphatdiesterbindung durch einen konservierten Tyrosinrest vermittelt zu werden, wie auch für Picornaviren postuliert wird (Ambros und Baltimore, 1978). Caliciviren weisen zumindest einen hochkonservierten Tyrosinrest an Position 23 bis 30 auf. Eine solche Bindung wird auch für das „Cow pea mosaic virus“ angenommen (Stanley und van Kammen, 1979). Während das Poliovirus auf der Seite der RNA eine 5‘ Uridinbase zur Bindung mit dem Tyrosinrest aufweist (Ambros und Baltimore, 1978; Flanegan *et al.*, 1977), besitzen die Caliciviren ein konserviertes Guanidin am 5‘-Ende der genomischen und subgenomischen RNA (Meyers *et al.*, 1991). Der Vorgang einer Vpg-RNA-Bindung ist also nicht uneingeschränkt zu vergleichen.

Über die Vpg-RNA Bindung ist ebensowenig bekannt, wie über die eigentliche Funktion des Vpg. In der Literatur wurden hierzu verschiedene Theorien diskutiert.

Der erste Hinweis auf eine mögliche Funktion wurde schon 1978 von Burroughs und Brown geliefert, als sie das neu entdeckte Vpg caliciviraler RNA mit Proteinase K Verdau entfernten und so die Infektiosität der RNA zerstörten. Auch die *in vitro* Translation viraler RNA wurde durch Entfernung des Vpg reduziert (Herbert *et al.*, 1997). Ein cDNA Klon des FCV benötigte zur *in vitro* Transkription synthetischer RNA zwar nicht unbedingt ein Vpg, dafür war für eine erfolgreiche Virusgenerierung die Anheftung eines Analog zur cap-Struktur unbedingt notwendig (Sosnovtsev und Green, 1995). Es ist nicht geklärt, ob ein cap-Analog zusätzlich zum Schutz bzw. zur Stabilisation der RNA auch in der Translation involviert ist und mit dem Ribosom der Wirtszelle interagiert. Die Tatsache, dass die ersten Startcodons nur 17 und 19 Nukleotide vom 5‘-Ende der genomischen und subgenomischen RNA entfernt sind, läßt einen Kontakt des Vpg mit dem Ribosom plausibel erscheinen (Herbert *et al.*, 1997). Die mRNA des Poliovirus ist nicht an ein Vpg gebunden und seine genomische RNA dient erst als mRNA, wenn das Vpg entfernt wurde (Flanegan *et al.*, 1977; Nomoto *et al.*,

1977). Ob die genomische RNA direkt als mRNA fungiert und ob eine Entfernung des Vpg für die Translation der Calicivirus RNA nötig ist, bleibt unklar.

Eine zweite mögliche Funktion des Vpg könnte in der Transkription viraler RNA liegen. Es wird vermutet, dass das Poliovirus Vpg eine Initiationsstelle für die RNA-Synthese darstellt (Pettersson *et al.*, 1978) und möglicherweise als „Primer" für eine RNA-Polymerase dient (Flanegan *et al.*, 1977; Paul *et al.*, 1998). Das Poliovirus-Vpg und stärker noch dessen Vpg-Vorläuferprotein 3AB erhöht die Aktivität der viruskodierten RNA-Polymerase (Plotch und Palant, 1995). Auch für das FCV wurde ein Vpg-Vorläuferprotein entdeckt (Protein p30 zusammen mit Vpg: p43) (Sosnovtsev *et al.*, 2002). Dabei wird angenommen, dass das p30 als Membrananker für Vpg fungieren könnte, so dass das Vpg für die RNA-Replikation positioniert ist. Für eine produktive Virusinfektion war allerdings eine Trennung von p30 und Vpg nötig. Dies entspricht dem bei Picornaviren vermuteten Mechanismus, wobei das Vpg bei der Initiation der RNA-Synthese vom Vorläuferprotein getrennt wird (Takegami *et al.*, 1983; Kuhn *et al.*, 1987).

In einer weiteren Theorie wird die Möglichkeit diskutiert, dass calicivirales Vpg bei der Enkapsidierung eine Rolle spielen könnte (Dunham *et al.*, 1998). Auch für diese Theorie finden sich einige Anhaltspunkte in der Literatur. Bei Polioviren ist nur die an Vpg gebundene genomische RNA im Kapsid enthalten, die mRNA, welche kein Vpg besitzt, hingegen nicht (Flanegan *et al.*, 1977; Nomoto *et al.*, 1977). Beide, genomische und subgenomische RNA des RHDV und des NV werden enkapsidiert (Boga *et al.*, 1992; Meyers *et al.*, 1991; Dunham *et al.*, 1998). Ferner belegen neueste Untersuchungen, dass neben der genomischen auch die subgenomische FCV-RNA in viralen Partikeln vorhanden ist (Neill, 2002). Und nicht zuletzt enthalten Calicivirusvirionen zumindest drei Proteine – das Kapsid, das Vpg und das Produkt des terminalen Leserahmens (ORF3) (Sosnovtsev und Green, 2000), das ebenfalls hinsichtlich der Enkapsidierung der viralen RNA diskutiert wird (Neill *et al.*, 1991).

Die Untersuchung spezifischer Interaktionen zwischen Vpg und dem Kapsid, sowie dem Vpg und der 3D-Polymerase des Felinen Calicivirus ist Thema der vorliegenden Arbeit.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

Zellen

- CRFK (Katzennierenzelllinie)
- Fcwf (Katzenfetenzelllinie)
- BSR/T7 (Hamsternierenzelllinie)
- Hühnerfibroblasten (Hühnerembryonen)

Zellkulturmedien

- Dulbecco´s Minimal Essential Medium (Fa. Sigma)
  Mit Zusätzen:
  Nicht-essentielle Aminosäuren 100x (Fa. Biochrom) 1% (v/v)
  pH 7,5
- Glasgow Minimal Essential Medium (BHK21) (Fa. Sigma)
  Mit Zusätzen:
  MEM Aminosäuren 50x (Fa. Sigma) 2% (v/v)
  Tryptose phosphate broth (Fa. Sigma) 10% (v/v)
  pH 7,5

Bakterien und Plasmide

Bakterien

- *E.coli* Stamm: TOP10 (Fa. Invitrogen)
- *E.coli* Stamm: TOP10F' (Fa. Invitrogen)
- *E.coli* Stamm: M15 (Fa. QIAGEN)

Plasmide

- pcDNAI/Amp (Fa. Invitrogen)
- pcDNA3.1- (Fa. Invitrogen)
- pcDNA3.1myc/HisA+ (Fa. Invitrogen)
- pCR2.1 (Fa. Invitrogen)
- pQE 30 (Fa. QIAGEN)
- pQE 60 (Fa. QIAGEN)
- pT7GFP (Dr. Sutter, GSF München)

.

Antikörper und Antiseren

- Anti-rabbit-FITC IgG (Fa. Sigma)
- Anti-mouse-POD IgG (Fa.Sigma)
- Anti-rabbit-POD IgG (Fa. Sigma)
- Anti-c-myc monoklonaler Antikörper (Fa. Roche)
- Anti-FCV-ORF3-Serum (Etschmann, Diss. 2002)
- Anti-FCV-Kapsid-Hybridomaüberstand (Schneider, Diss.1999)
- Anit-FCV-Kapsid-Kaninchenserum (Geissler, Staber)

Verwendete Kits

- ABgene 1.1xPCR Master Mix (1.5 mM $MgCl_2$) (Fa. ABgene)
- BCA-Kit (Fa. Pierce)
- ECL Chemiluminescenz Detektion Kit (Fa. Amersham)
- Immunoprecipitation Kit (Protein A) (Fa. Roche)
- QIAfilter™ Plasmid Midi Kit (Fa. QIAGEN)
- QIAprep® Miniprep Kit (Fa. QIAGEN)
- QIAquick® Gel Extraction Kit (Fa. QIAGEN)
- QIAquick® PCR Purification Kit (Fa. QIAGEN)
- RNeasy RNA-Purification Kit (Fa. QIAGEN)
- Superscript™ Reverse Transcriptase (Gibco BRL)
- TA-Cloning Kit (Fa. Invitrogen)

Puffer, Lösungen und Reagenzien

- Acrylamid/Bisacrylamid 30% (Rotiphoresegel 30, Fa. Roth)
- Agarose: peqGOLD Universal Agarose (Fa. Peqlab)
- Ammoniumpersulfat (APS) 10% für SDS-PAGE

  APS (Fa. Roth) 10% (w/v)

  destilliertes Wasser
- Antibiotika:

  Ampicillin (Fa. Sigma)

  Kanamycin (Fa. Sigma)

  Penicillin G (Fa. Bayer)

  Streptomycin (Fa. Grünenthal)

  Tylosin 1000x (Fa. Sigma)

- Blocking Puffer für Immunfluoreszenztest:
  Fetales Kälberserum (FKS) (Fa. Biochrom) 10% (v/v)
  in PBS (siehe dort)
- Blocking Puffer für Western Blot:
  Magermilchpulver (Fa. Merck) 10% (w/v)
  in PBS-T (siehe dort)
- Boratpuffer
  Natriumborat (Fa. Sigma) 0,5 M
  NaCl (Fa. Sigma) 0,5 M
  pH 7,4
- Bovines Serumalbumin (BSA) (Fa. New England Biolabs)
- Caesiumchloridpuffer
  Caesiumchlorid (Fa. Sigma) 30% (w/v)
  destilliertes Wasser
- Calf Intestine Phosphatase (CIP) (Fa. New England Biolabs)
- Coomassie-Färbelösung für Polyacrylamidgele
  Brilliant Blau G250 (Fa. Roth) 0,1% (w/v)
  Methanol (Fa. Roth) 50% (v/v)
  Essigsäure (Fa. Roth) 10% (v/v)
  destilliertes Wasser
- DEPC-PBS
  Diethylpyrocarbonat (Fa. Sigma) 0,1% (v/v)
  in PBS (siehe dort)
- Desoxyribonukleotid-5'-Phosphat (dNTP) (Fa. Roche)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Fa. Sigma)
- Elektrodenpuffer für Western Blot
  Methanol (Fa. Merck) 20% (v/v)
  Elektrophoresepuffer für SDS-PAGE (siehe dort)
- Elektrophoresepuffer für SDS-PAGE
  Tris (Fa. Roth) 25 mM
  Glycin (Fa. Roth) 190 mM
  SDS (Fa. Roth) 3,5 mM
  destilliertes Wasser
  pH 8,3

.

- Elektrophoresepuffer für Agarosegele (TAE-Puffer) 1x

Tris-HCl (Fa. Roth)	40 mM
Ethylendiamintetraacetat (EDTA) (Fa. Roth)	2 mM
destilliertes Wasser	
pH 8,0	

- Entfärbelösung für Polyacrylamidgele

Methanol (Fa. Merck)	10% (v/v)
Essigsäure (Fa. Merck)	10% (v/v)
destilliertes Wasser	

- Ethidiumbromid (Fa. Sigma)
- Ethanol absolut (EtOH abs.) (Fa. Merck)
- Fetales Kälberserum (FKS) (Fa. Biochrom)
- Fixationslösung für Immunfluoreszenz

Aceton (Fa. Applichem)	50% (v/v)
Methanol (Fa. Merck)	50% (v/v)

- FuGene6® Transfektionsreagenz (Fa. Roche)
- Glycerin (Fa. Merck)
- Isopropanol (Fa. Roth)
- Kodak GBX Developer (Fa. Sigma)
- Kodak GBX Fixer (Fa. Sigma)
- Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)

Bacto trypton (Fa. Difco)	1% (w/v)
Bacto yeast extract (Fa. Difco)	0,5% (w/v)
NaCl (Fa. Roth)	0,5% (w/v)
destilliertes Wasser	
pH 7,2	

- LB-Agarose-Platten mit Ampicillin (LB-Amp-Platte)

Bacto-agar (Fa. Difco)	1,5% (w/v)
Ampicillin (Fa. Sigma)	100 mg/l
LB-Medium	

- LB-Agarose-Platten mit Ampicillin, IPTG und X-Gal (LB-Z-Platten)

Bacto-agar (Fa. Difco)	1,5% (w/v)
Ampicillin (Fa. Sigma)	100 mg/l
X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indol-β-D-Galactosid) (Fa. Sigma)	80 mg/l

.

IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid) (Fa. Roth) 240 mg/l
LB-Medium

- Molekulargewichtsmarker für DNA:
  1kb DNA Ladder (Fa. New England Biolabs)
  100bp DANN Ladder (Fa. New England Biolabs)
- Molekulargewichtsmarker für Proteine: Prestained Protein Marker (Fa. New England Biolabs)
- Optimem (Fa. Gibco)
- Phosphate Buffered Saline (PBS) ohne Calcium und Magnesium

KCl (Fa. Roth)	2,7 mM
NaCl (Fa. Roth)	140 mM
Na_2HPO_4 (Fa. Merck)	6,5 mM
KH_2PO_4 (Fa. Merck)	1,5 mM

destilliertes Wasser
pH 7,5

- PBS-T Puffer

Tween 20 (Fa. Sigma)	0,1% (v/v)

PBS (siehe dort)

- Polyethylenglycol 6000 (PEG 6000) (Fa. Sigma)
- Polyacrylamidgele für SDS-PAGE

Trenngel (13%)

Acrylamid/Bisacrylamid (siehe dort)	4,5 ml
destilliertes Wasser	2,8 ml
Tris-Puffer 1,5M/pH 8,8 (siehe dort)	2,5 ml
SDS 10% (siehe dort)	100 µl
APS 10% (siehe dort)	65 µl
TEMED (siehe dort)	10 µl

Sammelgel

Acrylamid/Bisacrylamid (siehe dort)	1 ml
destilliertes Wasser	3,36 ml
Tris-Puffer 0,5M/pH 6,8 (siehe dort)	1,66 ml
SDS 10% (siehe dort)	33 µl
APS 10% (siehe dort)	330 µl
TEMED (siehe dort)	15 µl

.

- Probenpuffer SDS-PAGE 2x

Tris-Cl (Fa. Roth)	125 mM
Glycerin (Fa. Roth)	50% (v/v)
SDS (Fa. Roth)	12% (w/v)
Bromphenolblau (Fa. Roth)	0,05% (w/v)
β-Mercaptoethanol (Fa. Roth)	25% (v/v)
destilliertes Wasser	

- Probenpuffer DNA-Gelelektrophorese

Bromphenolblau (Fa. Roth)	0,05% (w/v)
TAE-Puffer (siehe dort)	49,95% (v/v)
Glycerin (Fa. Roth)	50% (v/v)

- Restriktionsenzyme (Fa. New England Biolabs)
- RNAse Inhibitor (Fa. Invitrogen)
- SDS 10% für SDS-PAGE

SDS (Natriumdodecylsulfat) (Fa. Roth)	10% (w/v)
destilliertes Wasser	

- SOC-Medium

Bacto Trypton (Fa. Difco)	2% (w/v)
Bacto Yeast Extract (Fa. Difco)	0,5% (w/v)
NaCl (Fa. Roth)	10 mM
KCl (Fa. Roth)	2,5 mM
$MgCl_2$ (Fa. Roth)	10 mM
$MgSO_4$ (Fa. Roth)	20 mM
Glukose (Fa. Roth)	2% (w/v)
destilliertes Wasser	

- Saline Trypsin Versene Lösung (STV)

NaCl (Fa. Roth)	137 mM
KCl (Fa. Roth)	5 mM
Dextrose (Fa. Sigma)	6 mM
$NaHCO_3$ (Fa. Roth)	7 mM
EDTA-Na_2 (Versene) (Fa. Roth)	540 µM
Trypsin (Fa. Roth)	0,05% (w/v)
destilliertes Wasser	

- TAE-Puffer (siehe Elektrophoresepuffer für Agarosegele)

.

- Tetramethylethylendiamin (TEMED) (Fa. Sigma)
- TFB1 Puffer

Kaliumacetat (Fa. Roth)	30 mM
$MnCl_2$ (Fa. Sigma)	50 mM
$RbCl_2$ (Fa. Sigma)	100 mM
$CaCl_2$ (Fa. Roth)	10 mM
Glycerin (Fa. Roth)	15% (v/v)

  destilliertes Wasser

  pH 5,8
- TFB 2 Puffer

MOPS (Fa. Roth)	10 mM
$CaCl_2$ (Fa. Roth)	75 mM
$RbCl_2$ (Fa. Roth)	10 mM
Glycerin (Fa. Roth)	15% (v/v)

  destilliertes Wasser

  pH 7,0
- T4-DNA-Ligase mit 10x Ligasepuffer (Fa. Invitrogen, Fa. New England Biolabs)
- Tris-Puffer pH 8,8 für SDS-PAGE

TrisHCl (Fa. Roth)	1,5 M

  destilliertes Wasser

  pH 8,8
- Tris-Puffer pH 6,8 für SDS-PAGE

TrisHCl (Fa. Roth)	0,5 M

  pH 6,8
- Tryptanblau (Fa. Sigma)

Geräte, Laborhilfsmittel und Verbrauchsmaterialien

- Bakterienschüttler (Fa. Edmund Bühler)
- Bakterienschüttler: Orbital Shaker OS 20 (Fa. BioSan)
- Brutschrank Modell QNW500TVBA (Fa. Nunc)
- Dialyseschlauch (Fa. Roth)
- Einmalkanülen Fine-Ject® (Fa. Henke Sass Wolf)
- Einmalspritzen Norm-Ject® (Fa. Henke Sass Wolf)
- Elektrophoresekammern für DNA-Agarose-Gele:

  The Centripede™ (Fa. Owl Scientific, inc.)

.

Modelle 40-1410, 40-0911 und 40-0708 (Fa. PeqLab)

- Elektrophoresekammer für SDS-PAGE: Mini Protean II (Fa. Biorad)
- Elektrophoretische Transferkammer (Western Blot): Mini Transblot II (Fa. Biorad)
- Filterpapier: Chromatography Paper 3MMCHR (Fa. Whatman)
- Flow: Herasafe (Fa. Heraeus)
- Folienschweißgerät: Folio (Fa. Severin)
- Fotofilm: Hybond-C extra (Fa. Amersham)
- Glaswaren (Fa. Biochrom, Fa. Schott)
- Heizblock: Thermomixer compact (Eppendorf)
- Laborwaage 440-43 (Fa. Kern)
- Mikrowelle: Cookmate (Fa. Daewoo)
- Mikroskop für Immunfloureszenz: Axioskop 2 plus (Fa. Zeiss)
- Mikroskop: Leica DMIL (Fa. Leica)
- Nitrozellulosemembran: Hybond (Fa. Amersham)
- Objektträger (Fa. Marienfeld)
- PH-Meter (Fa. Beckman)
- Pipetten: Pipetman (Fa. Gilson)
- Pipetten Glas (Fa. Witeg, Fa. Brand)
- Pipettenspitzen (Fa. Gilson, Fa. Roth, Fa. Sarstedt)
- Pipettierhilfe accu-jet® (Fa. Brand)
- Photometer:
  Uvicon 860 XS (Fa. Bio-tek Instruments)
  Smart Spec™ 3000 (Fa. BioRad)
- Power-Supply:
  Power Pac 300 (Fa. BioRad)
  Power Pac 3000 (Fa. BioRad)
- Reaktionsgefäße:
  500PP 1,5 ml (Fa. Greiner bio-one)
  Falcons 15 ml, 50 ml (Fa. Nunc)
- Roller-Schüttler SRT-1 (Fa. Stuart Scientific)
- Rührplattform IKA-Combimag Reo (Fa. IKA-Werk)
- Schwenkapparatur: Mini Rocking Platform (Fa. Biometra)

.

- Software:
  Primer-Analysis Software OLIGO 4.1 (Fa. National Biosciences)
  Lasergene (DNASTAR, Inc.)
  LabPowerJ Uvikon (Fa. Bio-tek Instruments)
  Jellyfish 1.5 (Fa. Biowire)
- Thermocycler DNA Engine PTC 200 (Fa. Biozym)
- Ultraschallgerät: Sonifier® Cell disruptor (Fa. SmithKline)
- UV-Geldokumentation: Gel Doc 1000 (Fa. BioRad)
- UV-Kunststoffküvetten Plastibrand® (Fa. Brand)
- UV-Transilluminator 302 nm (Fa. LTF)
- Vakuumpumpe (Fa. KNF Neuberger)
- Vortexgerät: Reax top (Fa. Heidolph)
- Wasserbad WB 7 (Fa. Memmert)
- Zellkulturplastikwaren:
  Zellkulturflaschen (175 cm^2, 75 cm^2, 25 cm^2) Nunclon™ (Fa. Nunc)
  6-, 24-, 96-Lochplatten Nunclon™ (Fa. Nunc)
- Zellschaber (Fa. Nunc)
- Zellzählkammer nach Fuchs-Rosenthal (Fa. Neubauer)
- Zentrifugen:
  Kühlzentrifugen:
  Centrifuge 5810 R (Fa. Eppendorf)
  2K15 (Fa. Sigma)
  Tischzentrifugen:
  Centrifuge 5415 D (Fa. Eppendorf)
  MiniSpin (Fa. Eppendorf)
  Micro Centrifuge SD (Fa. Roth)
  Vakuumtrockenzentrifuge: Concentrator 5301 (Fa. Eppendorf)

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkulturverfahren

3.2.1.1 Kultivierung von CRFK- und Fcwf-Zellen

Crandell-Reese-Feline-Kidney (CRFK)-Zellen sind eine permanente Zelllinie, die ursprünglich aus den Nieren einer Hauskatze gewonnen wurde (Crandell *et al.*, 1973).

Neben FCV ist diese Zelllinie kompetent für zahlreiche andere feline Viren (Felines Panleukopenievirus, Felines Herpesvirus, Felines Leukämievirus und andere) und einige nicht feline Viren (Herpes-simplex Virus, Canines Parvovirus, Bovines Parainfluenzavirus).

Felis catus whole fetus (Fcwf)-Zellen stammen aus einer permanenten Zelllinie, die aus Katzenfeten generiert wurde und ist unter anderem auch für das feline Coronavirus empfänglich.

Die Zellen wurden in Dulbecco‘s Minimal Essential Medium (DMEM) mit 5-10% FKS ohne Antbiotikum gehalten und regelmäßig (alle 2-3 Tage) passagiert. Die Passagen erfolgten durch Ablösen des einschichtigen, adhärenten Zellrasens (90-100%ig konfluent) mit saliner Trypsin-Versen –Lösung (STV) und anschließender Resuspension eines Teils der Zellen in frischem Medium. Die Zellen wurden in Plastik-Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37°C inkubiert, wobei Zellen auf Platten zusätzlich in einer feuchten Atmosphäre mit 5% CO_2 gehalten wurden.

3.2.1.2 Kultivierung von BSR-T7-Zellen

Bei BSR-T7-Zellen handelt es sich um eine permanente modifizierte Zelllinie, die ursprünglich aus den Nieren junger Hamster gewonnen wurde (Baby Hamster Kidney cells, BHK). Sie zeichnet sich durch eine stabile Expression einer ins Wirtszellgenom integrierten T7-Polymerase aus, wodurch eine transiente zytoplasmatische Expression transfizierter Gene ermöglicht wird, die unter Kontrolle eines T7-Promotors stehen.

Die Zellen wurden in Glasgow Minimal Essential Medium unter Zusatz von 5-10% FKS und ohne Antibiotikum kultiviert. Die Passagierung erfolgte analog der CRFK-und Fcwf-Zelllinien (vgl. 3.2.1.1).

3.2.1.3 Kultivierung von Hühnerfibroblasten

Hühnerfibroblasten werden aus Hühnerembryonen gewonnen. Dazu wurden 10 befruchtete Hühnereier 10 Tage bei 37°C und 60-80% Luftfeuchtigkeit bebrütet. Die Eier wurden nach Ablauf der Bebrütungszeit mit Alkohol desinfiziert, die Embryonen unter sterilen Bedingungen entnommen und kurz in PBS gewaschen. Der Kopf sowie die inneren Organe wurden entfernt. Das restliche Gewebe wurde noch einmal in PBS gewaschen, anschließend durch eine 50 ml Einwegspritze in einen Kolben mit 250 ml 1%iger Trypsin/PBS-Lösung gepresst und 10 Minuten bei 37°C gerührt. Danach wurde die Suspension durch ein Gazetuch in einen neuen Becher gegossen und der Rückstand erneut gerührt und filtriert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Das Filtrat wurde 10 Minuten bei 1000 g und 4°C zentrifugiert und das Sediment in Dulbecco`s Minimal Essential Medium resuspendiert. Die so gewonnenen Zellen wurden in einer Konzentration von $5x10^5$ Zellen/ml in Zellkulturflaschen ausgesät. Nachdem die Fibroblasten Konfluenz erreicht hatten, konnten sie ein weiteres Mal 1:3 bis 1:5 geteilt werden, um sekundäre Kulturen zu erhalten.

3.2.1.4 Kryokonservierung von Zellen

Um Zellen langfristig verwahren zu können, wurden etwa $1x10^6$ Zellen mit STV abgelöst, bei 1000 rpm 10 Minuten abzentrifugiert und das Zellpellet in Medium mit 10% FKS und 10% DMSO aufgenommen. Die so aufbereiteten Zellen wurden in Kryoröhrchen abgefüllt, zunächst bei –20°C gefroren und anschliessend in flüssigen Stickstoff verbracht.

3.2.2 Virus

3.2.2.1 Verwendete Virusisolate

Das FCV-Isolat KS20, welches aus einer Katze mit Katzenschnupfensymptomatik 1995 am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München isoliert worden ist, bildet die Grundlage der vorliegenden Arbeit.

3.2.2.2 Viruspropagierung in Zellkultur

CRFK-Zellen, die in einer 300 cm² Zellkulturflasche zu einem etwa 50-70% konfluentem Zellrasen ausgewachsen waren, wurden mit Virionen des Isolates FCV-KS20 mit einer Infektionsmultiplizität (multiplicity of infection, moi) von 10 infiziert. Nach 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank, zeigte sich ein deutlicher zytopathischer Effekt, der durch Ablösung der

Zellen vom Kulturgefäßboden ohne Bildung von intrazellulären Einschlusskörperchen gekennzeichnet war.
Zur Freisetzung der Virionen aus den infizierten Zellen erfolgte ein Frier-/Tauzyklus. Die im Kulturüberstand schwimmenden Zelltrümmer wurden durch anschließende Zentrifugation bei 1500 g über 10 Minuten abgetrennt. Als Endprodukt entstand eine klare, virushaltige Flüssigkeit, die bei –70°C gelagert wurde.

3.2.2.3 Aufreinigung der Virionen

Die Reinigung von FCV-Virionen erfolgte 24-48 Stunden nach Infektion feliner Zelllinien (CRFK oder Fcwf) mit Virionen des KS20-Isolates bei einer moi von 10. Nach Gewinnung eines klaren, virushaltigen Überstandes durch Freisetzung der Virionen aus den Zellen durch Frier-/Tauzyklus und anschließender Zentrifugation (vgl. 3.2.2.2), wurde dessen Gesamtvolumen bestimmt. Es wurden 10% (v/v) einer 5 molaren NaCl-Lösung hinzugefügt, sowie durch Zugabe von 10% (w/v) PEG 6000 das Virusmaterial gefällt. Diese Suspension wurde bei 4°C 24 Stunden gerührt. Dann wurde die milchig-trübe Lösung bei 4000 g für 30 Minuten zentrifugiert und der Niederschlag in 4 ml Boratpuffer resuspendiert.
Zur isopyknischen Dichtegradienten-Zentrifugation wurden zunächst 4 ml Cäsiumchloridpuffer (30% w/v) in ein SW50-Zentrifugenröhrchen (Fa. Beckmann) überführt, darauf 1 ml des resuspendierten Niederschlags aufgetragen und 24 Stunden bei 40.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach der Entnahme der Röhrchen zeigte sich im einfallenden Licht eine opake Bande, die durch seitliches Einstechen einer Injektionsnadel entnommen wurde. Die so gewonnene stark virushaltige Suspension wurde in Boratpuffer 1:10 (v/v) verdünnt und erneut 3 Stunden bei 25.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde in 100-500 µl PBS aufgenommen.

3.2.2.4 Kultivierung des Vaccinia-Virus MVA/T7

Das modifizierte Vaccinia-Virus MVA/T7 (Modified Virus Ankara) zeichnet sich durch eine stabil ins Genom integrierte RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 aus. Das T7-Polymerase-Gen steht unter dem Vaccinia-eigenen 7,5-Promotor (P7,5), der für eine frühe, hohe Expressionsrate der Polymerase in der vom Vaccinia-Virus infizierten Zelle sorgt. Das MVA/T7- Virus stand aus einer vorangegangenen Arbeit (Geissler, 1998) zur erneuten Kultivierung zur Verfügung.
Zunächst wurden primäre oder sekundäre Hühnerfibroblasten kultiviert und die Zellen mit MVA/T7 infiziert (moi 1). Nach einer Inkubation von 48-72 Stunden bei 37°C zeigte ein deutlicher zytopathischer Effekt die erfolgreiche Infektion der Hühnerfibroblasten an. Um

zytoplasmatische Virionen freizusetzen wurde ein Frier-/Tauzyklus insgesamt 3mal durchgeführt und die Zellen zusätzlich durch Ultraschall (200 Watt, 1 Minute) zerstört. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 1500g (30 Minuten) und 4°C entfernt und der klare virushaltige Überstand aliquotiert.

Spezifikation des MVA/T7

Zur Spezifikation wurden CRFK- oder Fcwf-Zellen mit dem Überstand infiziert und mit pT7GFP (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Gerd Sutter, GSF München) transfiziert. Das Green Fluorescent Protein (GFP) stammt aus der Qualle Aequorea victoria, wobei durch die Übertragung von Energie von dem Photoprotein Aequorin auf das GFP Licht produziert wird (Ward *et al.*, 1980). Prokaryotisch oder eukaryotisch exprimiertes GFP wird durch blaues oder UV-Licht (λ 488 nm) angeregt und floureszierd hellgrün. Mit Hilfe einer PCR wurde GFP aus pEGFP-1 (Fa. Clontech) amplifiziert und in das Plasmid pIIIT7emc kloniert, so dass das GFP durch T7-Promotor und Terminator Sequenzen zusammen mit einer Enzephalomyocarditis-Virus (EMCV)-Enhancer-Region reguliert wird (Moss *et al.*, 1990). Als Spezifikationsparameter für die neue MVA/T7-Virus-Charge wurden die mit pT7GFP transfizierten grün leuchtenden Zellen quantitativ bestimmt und mit der Ausgangscharge verglichen. Die Effizienz sollte mindestens genauso hoch, wenn nicht sogar besser sein. Die Aliquots, die diesen Parameter erfüllten, wurden bis zur weiteren Verwendung bei –70°C weggefroren.

3.2.2.5 Virustitration

Zur Bestimmung der Anzahl infektionstüchtiger Virionen nach erfolgter Aufreinigung wurde ein Aliquot virushaltigen Zellkulturüberstandes in einer 11-stufigen 1:10 Verdünnungsreihe titriert. Feline Zellen (CRFK oder Fcwf) wurden mit einer Konzentration von $2x10^6$ in einer 96-Loch-Platte ausgesät (100 µl/Kavität) und 2 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 Begasung inkubiert. Die Verdünnungen der Virussuspension wurden in 8 Parallelansätzen auf die Zellen gegeben (100 µl/Kavität), wobei die 12. Reihe als Zellkontrolle diente. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 Begasung konnten die einzelnen Kavitäten nach Ausbildung eines zytopathischen Effektes beurteilt werden. Daraus wurde der Virustiter in KID_{50} (Kulturinfektiöse Dosis 50) nach Kaerber (Mayr *et al.*, 1997) berechnet. Eine KID_{50} ist diejenige Verdünnungsstufe, bei der 50% der Zellen einen zytopathischen Effekt zeigen. Sie ergibt sich aus folgender Gleichung:

Log KID_{50}	=	$L_{1,0} - L_{int}\ (S - 0{,}5)$
$L_{1,0}$	=	Logarithmus der höchsten Verdünnungsstufe mit der Reaktionsrate 1,0
L_{int}	=	Logarithmus des Verdünnungsintervalls
S	=	Summe der Reaktionsraten
0,5	=	Konstante

3.2.2.6 Isolierung viraler und gesamtzellulärer RNA

Die Isolierung viraler RNA erfolgte aus FCV-infizierten CRFK-Zellen (moi 10). Nach etwa 10 Stunden wurde das Kulturmedium entfernt und der Zellrasen vorsichtig zweimal mit DEPC vorbehandeltem PBS gewaschen. Mit einem Zellschaber wurde der Zellrasen vom Boden der Kulturflasche gelöst und in 50 ml DEPC-PBS aufgenommen. Dann wurde die Zellsuspension 10 Minuten bei 1500 g und 4°C zentrifugiert, der klare Überstand entfernt und die zelluläre und virale RNA aus dem Zellsediment mit Hilfe des RNeasy RNA-Purification-Kit® (Fa. Quiagen) über Affinitätssäulen isoliert. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Die in 30 µl RNAse freiem Wasser von der Affinitätssäule eluierte RNA wurde mit 1 µl RNAse-Inhibitor (10 Units) versetzt und bei –70°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.3 Transfektion viraler Gene in eukaryotische Zellen

3.2.3.1 Transfektion eukaryotischer Zellen mit Fugene6

Um Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen einzubringen stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. Für die transiente Transfektion können neben der Kalziumphosphat-Methode und der Elektroporation, Nukleinsäuren mit Hilfe von liposomalen Reagenzien transfiziert werden. Diese Methode wurde in der vorliegenden Arbeit vorrangig eingesetzt. Bei der liposomalen Transfektion binden negativ geladene Phosphatgruppen der DNA an die positiv geladene Oberfläche der Liposomen. Die positive Restladung der Komplexe vermittelt eine Bindung an die negativ geladenen Sialinsäurereste der Zelloberfläche. Die Mechanismen, durch die ein Eindringen der DNA-Liposomen-Komplexe erreicht wird sind noch unklar. Möglicherweise fusionieren die Liposomen (Felgner *et al.*, 1987) mit der Zelle oder die Komplexe werden durch Endozytosis in die Zelle aufgenommen.

Vor Beginn der Transfektion wurden etwa $4x10^6$ Zellen in einer 6-Loch-Platte eingesät, so dass sie am nächsten Tag eine 80%ige Konfluenz aufwiesen. Zu 97 µl Optimem (Fa. Gibco-BRL) wurden 3 µl Fugene6- Reagenz (Fa. Roche) hinzugefügt und vorsichtig durch Antippen des Reaktionsgefäßes gemischt. Dann wurde 1 µg DNA hinzugefügt, noch einmal vorsichtig gemischt und 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Kurz vor Ende dieser Inkubationszeit wurde das Kulturmedium der zu transfizierenden Zellen vollständig entfernt und die Zellen zweimal mit Medium ohne FKS gewaschen, um das restliche FKS des kompletten Mediums zu entfernen. Danach wurde 1 ml Medium ohne FKS pro Kavität zugegeben und der DNA-Liposomen-Komplex tropfenweise einpippetiert. Die Zellen wurden anschließend in einer 5%igen CO_2 Atmosphäre bei 37°C für 4 Stunden inkubiert. Nach Ablauf dieses Zeitraumes wurden die Zellen wieder mit Medium gefüttert, das zusätzlich FKS enthielt. Das DNA-Liposomen-Gemisch wurde auf den Zellen bis zur Auswertung der Proteinexpression belassen. Dazu wurden die Zellen 24 Stunden nach der Transfektion 2x mit eisgekühltem PBS gewaschen und mit STV oder einem sterilen Zellschaber vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Nach Zentrifugation bei 1500 rpm 10 Minuten dekantierte man den Überstand und wusch das Sediment nochmals mit eisgekühltem PBS. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde das Zellpellet bei –70°C gelagert.

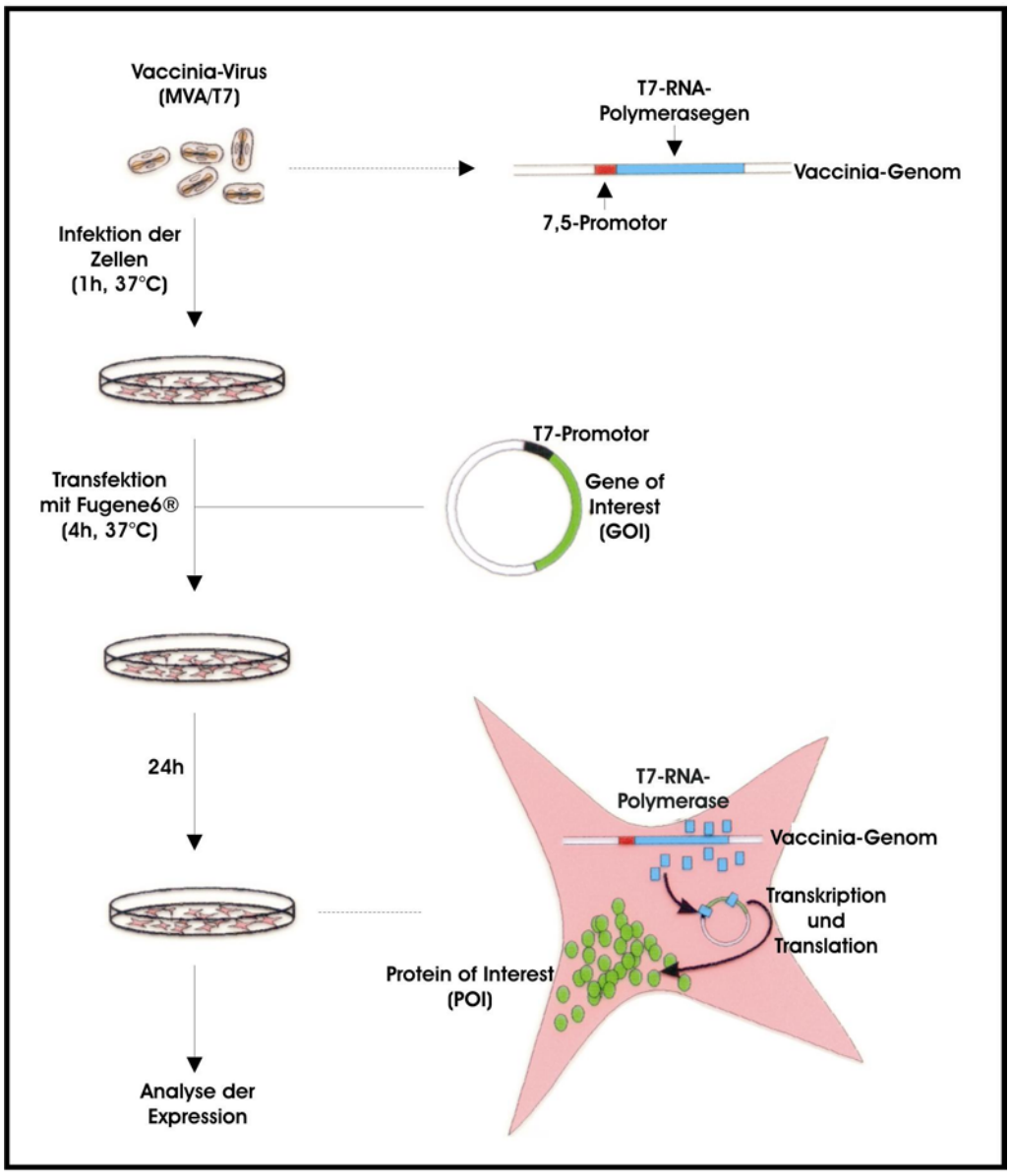
3.2.3.2 MVA/T7-Expressionssystem

Das MVA/T7-Expressionssystem ermöglicht es, Proteine im Zytoplasma eukaryotischer Zellen zu transkribieren und anschließend zu translatieren. Hierfür benutzt man ein rekombinantes MVA-Virus (Modified Virus Ankara), welches im Replikationszyklus die DNA-abhängige RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 (T7-Polymerase) in der infizierten Zelle zytoplasmatisch exprimiert. So können transfizierte Gene, die unter Kontrolle eines T7-Promotors stehen, zytoplasmatisch transkribiert werden.

Das zu transfizierende Gen wird dazu in einen geeigneten Expressionsvektors mit T7-Promotor kloniert. Am Tag vor der Transfektion wurden $4x10^6$ Zellen in einer 6-Loch-Platte eingesät. Die zu etwa 80% konfluenten Zellen wurden mit 2 ml MVA/T7-Virus pro Kavität (moi 10-100) infiziert und anschließend bei 37°C und 5% CO_2 Atmosphäre inokuliert. Danach wurde nicht adsorbiertes Virus durch zweimaliges Waschen mit Medium ohne FKS-Zusatz entfernt. Nach Zugabe von 1 ml Medium ohne FKS pro Kavität wurde, entsprechend der liposomalen Transfektion, das vorbereitete DNA-Lipidgemisch (vgl. 3.2.3.1) vorsichtig auf die Zellen pipetiert und 4 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Zellen mit jeweils 1 ml Standard-Kulturmedium mit FKS-Zusatz pro Kavität

gefüttert und weitere 24 Stunden im Brutschrank belassen. Während dieser Inkubationszeit wurde das GOI ohne posttranskriptionale Modifikationen durch die vom MVA/T7-Virus bereitgestellte T7-Polymerase im Zytoplasma der Zelle exprimiert. Die Zellen wurden dann mit eisgekühltem PBS 2x gewaschen, mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und bei 1500 rpm 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet bis zur weiteren Verarbeitung bei –70°C gelagert. In Abbildung 5 soll das Prinzip des MVA/T7-Expressionssystems veranschaulicht werden.

Abbildung 5: MVA/T7-Expressionssystem



MVA/T7-Expressionssystem: Durch Infektion der Zellen mit MVA/T7-Viren wird zytoplasmatisch die T7-Polymerase exprimiert, die eine Transkription der transfizierten FCV-Gene, die unter T7-Promotor-Kontrolle stehen, bewirkt.

3.2.4 DNA-Analysen

3.2.4.1 Sequenzanalysen

Zur Erstellung von Sequenz- und Restriktionsenzymkarten sowie für Sequenzanalysen wurde das Computerprogramm Lasergene (Fa. DNASTAR, Inc.) eingesetzt. Ferner wurde das Programm Jellyfish Version 1.5 (Fa. Biowire) für Sequenzvergleiche verwendet.

3.2.4.2 DNA-Sequenzierung

Die in unterschiedliche Vektoren klonierten DNA-Fragmente wurden von der Fa. MWG-Biotech (Ebersberg) sequenziert. Die dafür notwendigen spezifischen Oligonukleotide (Primer) wurden analog der erwarteten Sequenz von MWG-Biotech synthetisiert.

3.2.4.3 Synthetische Oligonukleotide

Zur Vervielfältigung spezifischer DNA-Abschnitte wurde die Polymerase-Kettenreaktion verwendet. Dazu wurden zunächst Oligonukleotide mit einer definierten Sequenz synthetisiert (Fa. MWG Biotech, Ebersberg). Die Auswahl der Primer erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms OLIGO® Version 4.1 (Fa. National Biosciences). Die Oligonukleotide wurden lyophilisiert geliefert und zu einer Gebrauchskonzentration von 100 pmol/µl in Wasser gelöst.

3.2.4.4 Reverse Transkription mit Polymerase-Kettenreaktion

Die als Template dienende genomische RNA des felinen Calicivirus musste vor einer PCR mit Hilfe einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden (Erststrangsynthese, first strand synthesis). Als Endprodukt stand in vielfacher Kopie gebildete doppelsträngige lineare DNA zur Verfügung, deren Sequenz durch das eingesetzte RNA-Template und die verwendeten Primer determiniert wurde.

Vor der Durchführung der reversen Transkription wurde die aus FCV-infizierten Zellen gewonnene RNA (6 µl ≈ 2 µg) 5 Minuten bei 70°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. Der Reaktionsansatz wurde wie folgt erstellt:

Tabelle 1: Reaktionsansatz zur reversen Transkription

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
RT-Reaktionspuffer 5x	4 µl	1x
DDT (100 mM)	2 µl	10 mM
RNAse-Inhibitor	1 µl	10 U
dest. Wasser	1 µl	-
reverseTranskriptase (RTsuperscript)	1 µl	1 U/µl
dCTP	1 µl	1 mM
dGTP	1µl	1 mM
dTTP	1 µl	1 mM
dATP	1 µl	1 mM
Primer antisense	1 µl	5 pM/µl
RNA denaturiert	6 µl	0,1 µg/µl
Gesamtvolumen	20µl	-

Die reverse Transkription wurde bei 42°C für 1 Stunde im Thermocycler durchgeführt.

3.2.4.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um eine spezifische DNA-Sequenz zu amplifizieren wurde die PCR verwendet. Als Template diente entweder synthetisierte cDNA direkt nach der reversen Transkription oder DNA-Sequenzen aus Plasmidpräparationen.

Die Standard-PCR (Saiki *et al.*, 1988) erfolgt in drei Schritten. In der ersten Phase, der sogenannten Denaturation, wird dabei die als Matrize dienende doppelsträngige DNA bei 94°C geschmolzen. An die so entstandene Einzelstrang-DNA binden am 5`-und am 3`-Ende die synthetisch hergestellten Oligonukleotide (Primer-Annealing). Die Schmelztemperatur richtet sich hierbei nach Vorgabe der gewählten Primer. Dann erfolgt die Neustrangsynthese (Elongation), die von einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase durchgeführt wird. In der vorliegenden Arbeit wurde mit reiner Taq-Polymerase gearbeitet, deren optimaler Temperaturbereich bei 72°C liegt. In einem Thermocycler werden diese drei unterschiedlichen Temperaturstufen in mehreren Zyklen durchlaufen, so dass der von den Primern flankierte Bereich der Template-DNA exponentiell vermehrt wird.

Der Reaktionsansatz wurde wie folgt erstellt:

Tabelle 2: Reaktionsansatz für die PCR

Komponenten	Volumen
Template-DNA (bei 1-100 ng/µl)	3 µl
Primer (sense)	1 µl
Primer (antisense)	1 µl
PCR Master Mix 1,1x (ThermoPrime Plus® MasterMix PCR-kit (Fa. Abgene))	45 µl
Gesamtvolumen	50 µl

Tabelle 3: Zyklusbedingungen der PCR

PCR-Temperaturprofil im Thermocycler:			
Initiale Denaturierung	94°C	5 Minuten	1x
Denaturierung	94°C	1 Minute	20x
Annealing	T_m°C	2 Minuten	
Elongation	72°C	3 Minuten	
Finale Elongation	72°C	5 Minuten	1x
Kühlen	4°C	unendlich	

T_m = Schmelztemperatur der beiden verwendeten Primer

Nach Beendigung der PCR wurden die Ansätze mittels des QIAquick PCR Purification Kit (Fa. Qiagen) gereinigt (vgl. 3.2.4.9) und bei –20°C gelagert.

3.2.4.6 DNA-Gelelektrophorese

Qualitative Gelelektrophorese

Zur qualitativen Überprüfung von DNA-Präparationen wurden, je nach Größe der zu erwartenden DNA-Moleküle, 0,5-2%ige TAE-Agarosegele verwendet. Dazu wurde Agarose in entsprechender Konzentration in TAE-Puffer gelöst, aufgekocht, in die vorbreitete Agarose-Gelelektrophoresekammer (Fa. Peqlab) gegossen und bei Raumtemperatur bis zur Verfestigung des Gels inkubiert. In die Laufapparatur der Kammer wurde TAE-Puffer gefüllt und das Gel eingesetzt. Danach versetzte man die jeweiligen Proben mit 20% (v/v) Probenpuffer, pipettierte das Gemisch in die Geltaschen des vorbereiteten Agarosegels und

fügte einen DNA-Standard bekannter Basengröße (kb-Ladder, Fa. New England Biolabs) in einer separaten Geltasche hinzu. Mit einer Elektrodenspannung von 10-15 V/cm wurde die DNA autgetrennt, bis die Bromphenolblau-Front des Probenpuffers etwa zwei Drittel der Länge des Gels zurückgelegt hatte. Danach wurden die Gele für 20 Minuten in Ethidiumbromid-Lösung gefärbt, auf einem UV-Illuminator (λ 405 nm) sichtbar gemacht und das Bandenmuster durch Fotographie dokumentiert.

Präparative Gelelektrophorese

Um DNA aus einer Präparation zu isolieren wurde die präparative Gelelektrophorese angewendet. Dazu wurden die Proben wie in der qualitativen Gelelektrophorese vorbereitet und aufgetrennt. Nach Färbung der Gele in Ethidiumbromid-Lösung und Auswertung im UV-Licht, wurde die Bande der zu präparierenden DNA mit einem sauberen, scharfen Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten. Anschließend erfolgte die Reinigung der DNA mit Hilfe des QIAquick® Gel Extraction Kit (Fa. Qiagen) nach Herstellerangaben. Die DNA wurde in Wasser (pH 7,4) eluiert und bei –20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.4.7 Bestimmung der DNA-Konzentration

DNA-Präparationen wurden 1:200 verdünnt und die DNA-Konzentration der Lösung mit Hilfe des LabPowerJ Uvikon (Fa. Bio-tek Instruments) Photometers gemessen. Dabei wurden UV-Kunststoffküvetten verwendet und eine Konzentrationskurve durch Messung bei λ 220 bis 300 nm erstellt. Die Durchführung erfolgte nach Vorgaben des Geräteherstellers. Der gemessene Höchstwert bei λ 258 nm wurde in die Formel

40 x Verdünnung (200) x OD 258

eingesetzt und so die DNA-Konzentration der Stammlösung in µg/ml berechnet.

3.2.4.8 Restriktionsenzymverdau von DNA

Restriktionsenzyme dienen der sequenzspezifischen Zerschneidung (Verdau) von DNA-Molekülen. Die dabei entstehenden DNA-Fragmente können zur qualitativen Überprüfung der verwendeten Präparationen herangezogen oder für die weitere Verarbeitung entsprechend präpariert werden. Die Restriktionsenzyme wurden von der Fa. New England Biolabs bezogen und der jeweilige Verdau nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurden pro µg einer wässrigen Nukleinsäurelösung 1-5 Units des Enzyms zugefügt, sowie der vom Hersteller mitgelieferte Reaktionspuffer eingesetzt. Die Inkubationstemperatur richtete sich nach dem gewählten Restriktionsenzym (in der Regel 37°C). Nach 2-16 Stunden wurden die

DNA-Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und bewertet oder präparativ weiterverarbeitet.

3.2.4.9 Aufreinigung kleinerer DNA-Mengen aus enzymatischen Reaktionen

Um kleinere DNA-Mengen aus enzymatischen Reaktionen wie PCR oder Restriktionsenzymverdau zu reinigen, wurde der QIAquick PCR Purification Kit (Fa. Qiagen) eingesetzt. Über Affinitätssäulen werden hierbei unreine wässrige Lösungen von Primern, Nukleotiden, Polymerasen und Salzen befreit und in Wasser (pH 7,4) eluiert. Die Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben. Die DNA-Lösungen wurden bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

3.2.4.10 DNA-Ligation

Zur Insertion viraler präparierter Fragmente in geeignete Vektoren (zur Generation neuer Plasmide z.B. für die Proteinexpression), ist eine Ligation notwendig. Dabei müssen die jeweiligen Enden von Vektor und Insert zueinander passen, was durch vorherige Behandlung der Nukleinsäuren mit den gleichen Enzymen erreicht wird. Es entstehen entweder kohäsive Enden, das heißt Fragmente mit Überhängen am 5‘und 3‘-Ende (sticky ends), oder solche ohne Überhänge (blunt ends). Durch eine DNA-Ligase können komplementäre 5‘Phosphat- und 3‘OH-Enden miteinander verknüpft werden. Die entsprechend vorbereiteten und gereinigten DNA-Fragmente wurden mit 10.000 Units T4-DNA-Ligase (Fa. New England Biolabs) pro µg DNA im mitgelieferten Puffer über Nacht bei 14°C inkubiert. Das Verhältnis von Insert zu Vektor betrug etwa 4:1. Der Ligationsansatz wurde entweder durch Erhitzen auf 65°C für 10 Minuten inaktiviert und anschließend bei –20°C gelagert oder sofort transformiert.

3.2.4.11 Transformation von Bakterien und Selektion auf Plasmidträger

Plasmid-DNA kann in Bakterien vermehrt werden. Dazu müssen die gewünschten Plasmide in sogenannte „kompetente“ Bakterien eingebracht werden. Dies wird durch die Transformation erreicht, die nachfolgend besprochen wird.

Herstellung kompetenter Bakterien

In der vorliegenden Arbeit wurde mit verschiedenen *E.coli* Bakterienstämmen gearbeitet: TOP 10, TOP 10F‘ (Fa. Invitrogen) und M15 (Fa. Qiagen). Zur Herstellung kompetenter, das heißt transformationsfähiger, Bakterien wurde die Calcium-Chlorid-Methode angewendet. Dazu wurde 1 ml einer frischen Übernachtkultur des jeweiligen Stammes in 100 ml LB-Medium inokuliert und bis zur optischen Dichte (OD 600) von 0,4 bis 0,5 bei 37°C unter

Schütteln inkubiert. Die auf Eis abgekühlte Bakteriensuspension wurde bei 3000 rpm und 4°C 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Das Pellet wurde in 30 ml eiskaltem TFB-I-Puffer resuspendiert und weitere 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem zweiten Zentrifugationsschritt bei 3000 rpm, 4°C 10 Minuten, wurde der Überstand vorsichtig dekantiert, das Sediment sofort in 4 ml eiskaltem TFB-II-Puffer aufgenommen und in Aliquots zu je 60 µl bei –70°C aufbewahrt.

Transformation kompetenter Bakterien

Die bei –70°C gelagerten kompetenten Bakterien wurden für wenige Minuten auf Eis aufgetaut. Dann wurde die Plasmid-DNA (z.B. die Hälfte eines Ligationsansatzes oder 50 ng einer Plasmidpräparation) durch vorsichtiges Umrühren mit der Pipettenspitze mit der Bakteriensuspension gemischt. Dieser Ansatz wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert und danach für 2 Minuten bei 42°C im Wasserbad einem Hitzeschock unterzogen. Dadurch erhöht sich die Permeabilität der Bakterien, so dass ein leichteres Eindringen der DNA in die Zellen gewährleistet wird. Die Suspension wurde sofort 2 Minuten auf Eis abgekühlt, 250 µl SOC-Medium zugegeben und bei 37°C für 90 Minuten geschüttelt. Jeweils 10 -200 µl des Ansatzes wurden auf vorgewärmten LB-Agarplatten ausgestrichen und für 12-24 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Auswahl des Selektionsantibiotikums im Plattennährmedium richtete sich je nach Resistenzgen des transformierten Plasmidvektors. In der Regel handelte es sich um Ampicillin (40 µg/ml) oder Kanamycin (10 µg/ml). Für einige Klonierungsschritte wurde in dieser Arbeit der Vektor pcDNA2.1 (Fa. Invitrogen) verwendet, welcher zusätzlich die Möglichkeit bietet, Insertionen durch sogenanntes „blue white screening“ zu selektieren. Dieser Vektor enthält eine für die β-Galaktosidase kodierende Genkassette, welche durch die Insertion von DNA unterbrochen wird. Durch Zugabe der Substrate X-Gal und IPTG in den Nährbodenplatten, sind Bakterienkolonien mit Vektoren ohne Insert an ihrer blauen Farbe zu erkennen. Weiße Kolonien enthalten sehr wahrscheinlich Vektoren mit dem gewünschten Insert.

3.2.4.12 Isolierung von Plasmid-DNA

Schnellpräparation kleinerer Mengen an Plasmid-DNA aus Bakterien (Mini-Prep)

Nach erfolgter Transformation kompetenter Bakterien müssen die gewachsenen Kolonien qualitativ auf positive Plasmidträger untersucht werden. Dazu wurden einzelne Bakterienkolonien mit einer Pipettenspitze gepickt und in 4 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin (oder entsprechend einem anderen geeigneten Selektionsantibiotikum) für 12-24 Stunden bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Aufreinigung erfolgte nach

.

Herstellerangaben über Affinitätssäulen mit Hilfe des QIAprep Miniprep Kits (Fa. Qiagen). Die gebundene DNA wurde mit Wasser (pH 7,4) eluiert und die Qualität der Plasmide entweder sofort durch Restriktionsenzymverdau bestimmt oder bei –20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Präparation größerer Mengen an Plasmid-DNA (Midi-Prep)

Für weitere Klonierungsschritte und für die Transfektion von Zellen wurden größere Mengen an Plasmid-DNA benötigt. Hierfür wurden plasmidtragende Bakterien in 100 ml LB-Medium mit einem geeigneten antibiotischen Zusatz 12-24 Stunden bei 37°C aufgeschüttelt. Zur Aufreinigung wurde der QIAfilter™ Plasmid Midi Kit (Fa. Qiagen) verwendet, wobei nach alkalischer Lyse der Bakterien die Plasmid-DNA an Anionenaustauscherharze gebunden wird. Es wurde nach Anleitung des Herstellers verfahren. Die Plasmide wurden in Wasser (pH 7,4) gelöst und die Konzentration photometrisch bestimmt. Die qualitative Überprüfung erfolgte durch Restriktionsenzymverdau. Zur Lagerung wurden die Präparationen bei –20°C weggefroren.

3.2.5 Protein-Analysen

3.2.5.1 Prokaryotische Proteinexpression

Rekombinante Proteine können über das QIAexpressionist™-System (Fa. Qiagen) prokaryotisch exprimiert werden. Hierzu stehen verschiedene Vektoren zur Verfügung, in die das GOI (gene of interest) einkloniert werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurden die Vektoren pQE 60 für das Vpg und pQE 30 für die Polymerase verwendet. Diese Vektoren zeichnen sich durch ein optimiertes Promotor-Operator-Element aus. Es besteht aus einem T5-Promotor, der von der *E.coli*-RNA-Polymerase erkannt wird, und einer lac-Operator Sequenz, die lac-Repressions-Protein bindet und so den starken T5-Promotor unterdrückt. Durch Zugabe von Isopropyl-β-D-Thiogalactosid (IPTG) wird die Expression des rekombinanten Proteins induziert, da IPTG an das lac-Repressions-Protein bindet und es inaktiviert. Außerdem wird das gewünschte Protein entweder C-terminal (pQE 60) oder N-terminal (pQE 30) mit einer Hexa-His-Tag-Struktur (Polyhistidine) verknüpft, die eine an die Expression anschließende Reinigung des Proteins ermöglicht.

Die zu exprimierenden Gene wurden mittels PCR amplifiziert und anschließend über entsprechend gewählte Restriktionsenzymschnittstellen in die entsprechenden Vektoren

eingesetzt. Dabei wurde darauf geachtet, dass der C-terminale His-tag im Leserahmen bestehen blieb. Die Sequenzen der Primer sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Verwendete Primer zur Amplifikation der 3D-Polymerase- und Vpg-Sequenzen von FCV-KS20 für die prokaryotische Proteinexpression

Primer	Sequenz	Annealingtemperatur
3D-Pol up (BamHI)	5‘-GGG GAT CCG GCA AGA GAA GAA TGA TCT GG-3‘	64,6°C
3D-Pol down (HindIII)	5‘-CCC AAG CTT TCA AAC TTC GAA CAC ATC ACA-3‘	64,5°C
Vpg up (NcoI)	5‘-GGG GCC ATG GCA AAA GGG AAA ACA AAA TCC AAA ATT-3‘	64,6°C
Vpg down (BglII)	5‘-GGA GAT CTT TCC TCT GCA AAG CTC ACG TC-3‘	64,5°C

Der Expressionsvektor mit dem GOI wurde in den *E.coli*-Stamm M15 (Fa. Qiagen) transformiert und auf positive Plasmidträger getestet. Diese wurden über Nacht in 100 ml LB-Medium mit Ampicillin- (100 µg/ml) und Kanamycin- (25 µg/ml) Zusatz bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden 5 ml der Suspension in 100 ml frische Nährbouillon inokuliert und nochmals 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Es wurde 1 ml der Kultur gezogen und als nicht-induzierte Probe verwahrt. Sodann wurde die Expression mit Zugabe von IPTG (1 mM) induziert und die Bakteriensuspension für zwei weitere Stunden im Brutraum geschüttelt.

3.2.5.2 IMAC Proteinreinigung

Die Aufreinigung der prokaryotisch exprimierten Proteine wurden mit Hilfe des Talon® Metal Affinity Resin (Fa. Clontech) durchgeführt, die auf dem Prinzip der Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC) (Porath *et al.*, 1975) beruht. Durch reversible Bindung zwischen verschiedenen Aminosäureseitenketten und immobilisierten Metallionen können Proteine unter nativen und denaturierenden Bedingungen voneinander getrennt werden. Dazu werden bei Talon® an eine Harzmatrix gebundene Kobaltionen verwendet, die unter physiologischen Bedingungen Histidine binden.

Nachdem die Proteinexpression durch IPTG induziert wurde (vgl. 3.2.5.1), zentrifugierte man die Bakteriensuspension 10 Minuten mit 6000 rpm. Das Pellet wurde mit 4 ml Lösung A

(Denaturing 1x Extraction/Wash Buffer, siehe Herstellerprotokoll) resuspendiert, 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert und die Bakterien durch zusätzliche Ultraschallbehandlung 15 Minuten auf Eis lysiert. Dieser Ansatz wurde 30 Minuten mit 10´000 rpm bei 4°C zentrifugiert und der Überstand vorsichtig in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. 1 ml Talon® Resin wurde mit Lösung A equilibriert (siehe Herstellerangaben), zum gereinigten Bakterienlysat gegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Das Resin/Lysat-Gemisch wurde in speziell vorbereitete Säulchen (siehe Protokoll) gefüllt und 10-15 Minuten nicht bewegt, so dass sich das Harz am unteren Ende der Säule sammeln konnte. Die im Harz eingeschlossenen Luftbläschen wurden durch vorsichtiges Klopfen entfernt und eine Fritte auf das Talon® Resin aufgebracht, um ein Austrocknen des Harzes zu verhindern. Dann ließ man den Überstand nach unten abfließen und wusch das Harz 5x mit Lösung A (je 5 ml), wobei die Eluate getrennt aufgefangen wurden. Die an das Resin gebundenen Proteine wurden anschließend mit 5 ml Lösung B (Imidazole/Elution Buffer, siehe Herstellerprotokoll) eluiert. Die Proteineluate wurden in Aliquots zu je 1 ml aufgeteilt und die Fraktionen über Nacht dialysiert.

3.2.5.3 Dialyse von Proteinen

Nach der Aufreinigung prokaryotisch exprimierter Proteine (vgl. 3.2.5.2) müssen Bestandteile des Elutionspuffers entfernt werden. Dafür wurde ein Dialyseschlauch (Fa. Roth) eine Stunde in Wasser ausgekocht und so in ein Reaktionsgefäß eingebracht, dass der Schlauch als Membran zwischen inhomogener Proteinlösung und destilliertem Wasser diente. Die Reaktionsgefäße beließ man über Nacht bei 4°C unter Rühren im Wasser, so dass kleinere Moleküle aufgrund des Konzentrationsgefälles durch die semipermeable Membran entweichen konnten. Die gereinigte Proteinlösung wurde bis zur weiteren Verwendung bei –70°C gelagert.

3.2.5.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur quantitativen Analyse der Proteine in einer Präparation wurde der BCA-Kit (Fa. Pierce) verwendet. Die Konzentrationsbestimmung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.2.5.5 Denaturierende Proteingelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Ermittlung des Molekulargewichtes von Proteinen und damit auch zur Auftrennung von Proteingemischen dient die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-

PAGE). Die stark negativ geladenen SDS-Moleküle legen sich um das Polypeptidgerüst der Proteine, so dass diese denaturieren und die Ladungen durch negative Ionisierung maskiert werden. Die Migration der Proteine im Polyacrylamidgel wird somit nicht mehr durch die elektrische Ladung bestimmt, sondern durch das Molekulargewicht. Die Matrixdichte der Gele kann durch unterschiedliche Acrylamid-Bisacrylamid-Konzentration variiert werden und richtet sich nach der Auflösungspräferenz und der erwarteten Größe der Proteine. Das Gel besteht zumeist aus zwei unterschiedlichen Anteilen, dem Sammelgel und dem Trenngel (nach Laemmli, 1970). Zur Herstellung der Gele und zur Elektrophorese wurde das Vertikalelektrophorese-System Mini-Protean II (Fa. BioRad) verwendet.

Herstellung der Gele

Zunächst wurden die Glasplatten der Apparatur mit 70%igem Alkohol entfettet und die Gießvorrichtung nach Anweisung des Herstellers zusammengesetzt. Dann wurde die Lösung für ein 13%iges Trenngel hergestellt, zwischen die Glasplatten eingefüllt und mit destilliertem Wasser überschichtet. Nach Polymerisation des Gels wurde das Wasser vorsichtig abgegossen und Reste mit einer geeigneten Spritze abgezogen. Die Lösung für das Sammelgel wurde auf das Trenngel gegossen und ein Probenkamm eingesetzt. Dieser wurde nach der Aushärtung des Gels gezogen, die Glasplatten in die Elektrophoresekammer eingesetzt und diese mit SDS-Puffer gefüllt. Die Geltaschen wurden mit SDS-Puffer gespült und die vorbereiteten Proben einpipettiert.

Vorbereitung der Proben

Verschiedene Proteinpräparationen (z.B. prokayotische oder eukaryotische Proteinexpressionen) können für die Gelelektrophorese vorbereitet werden. Um die Disulfidbrücken der Proteine zu reduzieren, wird den Probenpuffern 2-Merkaptoethanol zugegeben. In der vorliegenden Arbeit wurden die Proben mit 2x SDS-PAGE Probenpuffer versetzt und zum Scheren der DNA mehrmals durch eine Kanüle (21G) gezogen. Danach wurden die Suspensionen 5 Minuten bei 100°C denaturiert und 2 Minuten mit 12.000 rpm zentrifugiert.

Auftrennung der Proteine

Nachdem die Proben und ein Größenstandard (Protein Molecular Weight Marker, Fa. New England BioLabs) in die Geltaschen eingefüllt waren, erfolgte die Auftrennung der Proteine eine Stunde bei 170 V Elektrodenspannung.

Färbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie Färbelösung

Die aufgetrennten Proteine einer Präparation können mit Coomassie Brilliant Blau in einem Gel sichtbar gemacht werden. Dazu wurden die Polyacrylamidgele nach der Elektrophorese

.

eine Stunde in Coomassie Färbelösung und anschließend über Nacht in Entfärbelösung geschwenkt. Der Farbstoff bleibt auch nach der Entfärbung des Gels an den Proteinen haften, so dass sie als blaue Bande sichtbar werden. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,3-1 µg/Proteinbande. Die Gele wurden zur Konservierung auf Filterpapier gelegt und im Geltrockner (Fa. Biorad) 2 Stunden getrocknet.

3.2.5.6 Elektrotransfer und Immunodetektion von Proteinen (Western Blot)

Eine immunologische Charakterisierung der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wird durch den sogenannten Western Blot ermöglicht. Dazu müssen die Proteine nach der Elektrophorese auf einer Nitrozellulosemembran fixiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Elektrotransfer im Tankblotverfahren (Towbin *et al.*, 1979) durchgeführt, wobei die durch das SDS negativ geladenen Proteine durch ein elektrisches Feld aus dem Gel auf die Membran gezogen werden. Zur Immunodetektion der transferierten Proteine wird die Membran anschließend mit spezifischen Antikörpern inkubiert, die an bestimmte Proteine binden, und diese Bindung dann mit Hilfe eines Färbeverfahrens sichtbar gemacht. Dazu wurde das an einen Antikörper gekoppelte Enzym Meerrettich-Peroxidase verwendet, das sich mittels geeigneter Substrate durch Chemilumineszenz gut nachweisen lässt.

Das Polyacryamidgel wurde nach der Elektrophorese vorsichtig von den Glasplatten gelöst und luftblasenfrei auf eine mit Elektrodenpuffer getränkte Nitrozellulosemembran gelegt. Dann wurde zu beiden Seiten Filterpapier und Kunststoffschwämmchen, die ebenfalls in Puffer getränkt worden waren, aufgelegt, und nach Herstellerangaben in der Mini-Trans-Blot Apparatur (Fa. BioRad) angebracht. Die Kammer wurde mit Elektrodenpuffer gefüllt und mit einem Kühlelement versehen. Nachdem der Transfer 2 Stunden bei 70 V Elektrodenspannung durchgeführt worden war, wurden die Membranen vorsichtig aus der Anordnung entnommen und für mindestens 2 Stunden in Blocking Puffer bei 4°C geschwenkt. Die Nitrozellulose wurde dreimal 15 Minuten in PBS-T gewaschen und mit verdünntem Erstantikörper für mindestens 2 Stunden inkubiert. Monoklonale Antikörper wurden 1:10 bis 1:100, polyklonale Antikörper 1:1000 bis 1:5000 in Blocking Puffer verdünnt. Nach erneutem dreimaligem Waschen in PBS-T wurde der mit Meerrettichperoxidase konjugierte Zweitantikörper mit der Membran für 2 Stunden inkubiert. Der Zweitantikörper wurde so gewählt, dass er speziesspezifisch gegen den verwendeten Erstantikörper gerichtet war. In vorliegender Arbeit wurden die Antikörper Anti-mouse-POD und Anti-rabbit-POD (beide Fa. Sigma) verwendet und ebenfalls in Blocking Puffer 1:1000 bis 1:2000 verdünnt. Nach einem abschließenden dreimaligen Waschgang mit PBS-T wurde die Nitrozellulosemembran an drei Seiten in einer

Plastikfolie eingeschweißt. Die ECL-Reaktionsreagenzien (Fa. Amersham Pharmacia) wurden 1:1 zu einem Gesamtvolumen von 500 µl pro 10 cm^2 Membranfläche gemischt und sofort auf der Nitrozellulose verteilt. Nach 1 Minute wurde der Überschuß an Reagenzien aus der Folie gestrichen und ein Photofilm (Hyperfilm ECL, Fa. Amersham Pharmacia) in einer Dunkelkammer durch die aufgelegte Membran belichtet. Der Film wurde mit Kodak GBX Developer (Fa. Sigma) entwickelt, ein Mal in Wasser gewaschen und mit Kodak GBX Fixer (Fa. Sigma) fixiert. Die Proteinbanden waren durch Schwärzung des Photopapiers nachweisbar und konnten mit dem mitgeführten Proteinmarker abgeglichen werden.

3.2.5.7 Indirekte Immunfluoreszenz

Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz können virale Proteine, nach entsprechender Infektion, in fixierten Zellen immunologisch sichtbar gemacht werden. Dazu wurden Zellen auf Deckgläschen in einer 6-Loch-Platte kultiviert und mit FCV infiziert. Die Fixierung der Zellen erfolgte zu definierten Zeitpunkten. So wurde alle 60 Minuten je eine Kavität der 6-Loch-Platte fixiert, um den zeitlichen Verlauf der viralen Proteinexpression untersuchen zu können (time course). Das Kulturmedium wurde abpipettiert und die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgte mit einem Azeton/Methanol-Gemisch (1:1), das 2 Minuten auf den Zellen belassen und danach vorsichtig abgezogen wurde. Anschließend ließ man die überschüssige Fixierlösung unter dem Abzug abdampfen. In diesem Zustand konnten die Zellen mehrere Wochen bei –20°C gelagert werden, mussten dann aber vor den weiteren Arbeitsschritten 10 Minuten mit PBS rehydriert werden. Durch Zugabe von 1 ml 10%igem FKS in PBS (Blocking Puffer) pro Kavität wurden unspezifische Epitope der zu untersuchenden Proteine blockiert. Die Platten wurden dazu 1 Stunde bei Raumtemperatur leicht geschwenkt und anschließend dreimal je 2 Minuten in Waschpuffer (0,1%igem Triton X-100 in PBS) gewaschen. Dann wurden die Zellen mit in PBS verdünntem Erstantikörper (polyklonales Antiserum 1:250) bedeckt und 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einer Schwenkplatte inkubiert. Durch dreimaliges Waschen mit 0,1%igem Triton X-100 in PBS wurden überschüssige Antikörper entfernt und der in PBS verdünnte Zweitantikörper auf den Zellen für 1 Stunde unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur belassen. Es wurde ein fluoreszierendes Antikörper-Konjugat gewählt, das gegen die als Erstantikörper verwendete Tierart gerichtet war (Anti-rabbit-FITC, Fa. Sigma, Verdünnung 1:4000). Die Zellen wurden abschließend dreimal in Waschpuffer geschwenkt. Die Deckgläschen wurden vorsichtig aus den Kavitäten gehoben und unter Zugabe eines Tropfens PBS/Glycerin (1:1) mit der Zellseite

nach unten auf Objektträger gelegt. Die Ränder wurden mit Nagellack versiegelt und die Zellen sofort bei 405 nm mit einem inversen Immunfluoreszenzmikroskop untersucht.

3.2.5.8 Protein-Protein-Co-Immunopräzipitation

Ziel dieses Verfahrens ist es, eine Interaktion zwischen zwei Proteinen nachzuweisen. In vorliegender Arbeit wurde mit dem Immunoprecipitation Kit (Protein A) (Fa. Roche) gearbeitet. Das Prinzip der Co-Immunopräzipitation soll durch Abbildung 6 veranschaulicht werden. Um einen der möglichen Interaktionspartner an eine feste Phase binden zu können, mussten die gewünschten Nukleotidsequenzen durch PCR amplifiziert und in geeignete Vektoren kloniert werden. Es wurde der Expressionsvektor pcDNA3.1myc/HisA+ (Fa. Invitrogen) verwendet, der für ein c-myc-Epitop und eine Polyhistidinstruktur kodiert, die c-terminal des inserierten Gens exprimiert werden (Köderprotein). Der jeweilige Reaktionspartner wurde in den Vektor pcDNAI/Amp (Fa. Invitrogen) kloniert, so dass das Protein ohne zusätzliche Strukturen exprimiert werden konnte (Zielprotein).

Tabelle 5: Verwendete Primer zur Amplifikation der 3D-Polymerase- und Vpg-Sequenzen von FCV-KS20 für die eukaryotische Proteinexpression

Primer	Sequenz	Annealingtemperatur
3D-Pol up (BamHI)	5‘-GGG GAT CCG CC(AG) CCA TGG GCA AGA GAA GAA TGA TCT G-3‘	64,5°C
3D-Pol down (XhoI)	5‘-CCG CTC GAG AAC TTC GAA CAC ATC ACA-3‘	64,1°C
Vpg up (KpnI)	5‘-GGG GTA CCG CC(AG) CCA TGG CAA AAG GGA AAA CAA AAT CCA AAA T-3‘	64,4°C
Vpg down (XhoI)	5‘-CCG CTC GAG TTC CTC TGC AAA GCT CAC G-3‘	64,6°C

Nachfolgend wurden die Proteine mit Hilfe des MVA/T7-Expressionssystems exprimiert, die transfizierten Zellen mit PBS gewaschen und mit einem Zellschaber mobilisiert. Nach Zentrifugation 10 Minuten bei 1000 rpm wurde das jeweilige Zellpellet in 200 µl Lysispuffer (vgl. Kitprotokoll) resuspendiert. Nach einem Frier/Tauzyklus wurde die Suspension bei 10.000 rpm 10 Minuten und 4°C zentrifugiert und der Überstand weiterverarbeitet. Um eine Proteininteraktion zu ermöglichen wurden 200 µl des Köderproteins und 200 µl des

Zielproteins zusammengefügt und über Nacht bei 4°C auf einer Schwenkplatte inkubiert. Am nächsten Tag wurden unspezifische Bindungsstellen durch Zugabe von 25 µl Protein-A-Agarose blockiert. Nachdem dieser Ansatz 1 Stunde bei Raumtemperatur geschwenkt worden war, wurde die Agarose durch Zentrifugation 30 Sekunden bei 13.000 rpm wieder entfernt und zum Überstand ein gegen das Köderprotein gerichteter Antikörper zugegeben. In vorliegender Arbeit wurden 10 µg eines Anti-c-myc Antikörpers (Fa. Roche) pro Ansatz verwendet. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur auf einer Schwenkplatte wurde zur Bindung des Antikörpers 25 µl Protein-A-Agarose hinzugefügt und über Nacht bei 4°C geschüttelt. Die Waschpuffer 1, 2 und 3 wurden anhand des Kitprotokolls frisch hergestellt und bis zu ihrer Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt. Die nachfolgenden Zentrifugationsschritte wurden je 30 Sekunden bei 13.000 rpm und 4°C durchgeführt. Die Agarose wurde abzentrifugiert und der Überstand als „Flüssige Phase“ verwahrt. Das Agarose-Präzipitat wurde nacheinander in je 500 µl Waschpuffer 1, 2 und 3 gewaschen. Die Agarose wurde dabei bei jedem Waschgang 20 Minuten bei Raumtemperatur geschwenkt und durch Zentrifugation pelletiert. Nach dem letzten Waschschritt wurde das Agarose-Präzipitat in 30 µl 5x SDS-PAGE Probenpuffer resuspendiert, 3 Minuten bei 100°C denaturiert und zentrifugiert. Der Überstand wurde als „Feste Phase“ verwahrt. Ein Western Blot der Proben „Flüssige und Feste Phase“ diente dem Nachweis einer Immunopräzipitation. Dabei wurde eine immunologisch detektierbare Bande des Zielproteins in der „Festen Phase“ als positives Ergebnis gewertet.

.

3.2.6 Polyklonale Antikörper

3.2.6.1 Gewinnung polyklonaler Antikörper durch Immunisierung von Kaninchen

Um polyklonale Antikörper gegen ein gewünschtes Protein zu gewinnen, muss das Antigen an Tiere verimpft werden, die durch eine entsprechende Immunreaktion spezifische Plasmazellen bilden, die ihrerseits spezifische Antikörper produzieren. Das aus dem Blut der Tiere abgetrennte Serum enthält diese Antikörper und kann für verschiedene immunologische Nachweismethoden (z.B. Immunfluoreszenz oder Western Blot) verwendet werden.

Herkunft und Haltung der Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden 4 weibliche Kaninchen der Fa. Charles River Kisslegg in Laufställen des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin gehalten. Zur Zeit der Einstallung waren die Tiere 4 Wochen alt. Es standen ihnen täglich frisches Wasser und herkömmliches Kaninchentrockenfutter in Form von Pellets *ad libitum* zur Verfügung. Zusätzlich bekamen sie regelmäßig Salat und Karotten.

Immunisierung der Kaninchen

Die durch prokaryotische Expression gewonnenen Proteine wurden aufgereinigt, dialysiert und ihre Konzentration bestimmt. Zur Erstimmunisierung wurden 100-150 µg des gereinigten Proteins 1:1 mit Freund Adjuvans complete (Fa. Sigma) vermischt, wobei ein Volumen von 500 µl pro Injektion nicht überschritten wurde. Das Gemisch wurde in den *M. quadriceps femoris* injiziert. Zwei weitere Folgeimpfungen (Booster) wurden den Tieren im Abstand von jeweils 3 Wochen verabreicht. Es wurde dieselbe Menge der Proteinpräparation eingesetzt, jedoch mit Freund Adjuvans incomplete (Fa. Sigma) gemischt.

Gewinnung der Kaninchenseren

Vor der ersten und jeweils 10 bis 14 Tage nach jeder weiteren Immunisierung wurde den Kaninchen etwa 5 ml Blut aus der Ohrvene abgenommen. Die Kaninchen wurden 21 Tage nach der letzten Boosterung mit Ketamin/Xylazin (10-20 mg/kg Ketamin + 1-2 mg/kg Xylazin, i.m.) narkotisiert und durch Herzpunktion entblutet. Das in Glasröhrchen gefüllte Blut wurde 3 bis 4 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, der entstandene Blutkuchen von den Glaswänden gelöst und zur vollständigen Koagulation über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Das aus dem Blutkuchen ausgepresste Serum wurde vorsichtig abpipettiert, aliquotiert und bei 56°C 30 Minuten inaktiviert. Die Seren wurden bei –20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.6.2 Serumneutralisationstest

Neutralisierende Antikörper verhindern eine Zellinfektion nach Zugabe von Virionen zu einer Zellkultur. Diesen Umstand macht man sich beim Serumneutralisationstest zunutze, um Blutseren auf den Gehalt an spezifischen Antikörpern zu untersuchen. Zunächst wurden etwa $2x10^6$ Zellen in einer 96-Loch-Platte ausgesät und 2-3 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. In der Zwischenzeit wurden in einer separaten Mikrotiterplatte die zu untersuchenden Seren 1:10 vorverdünnt und anschließend eine 11stufige 1:2 Verdünnungsreihe erstellt. Das Gesamtvolumen betrug 50 µl. Dann wurden 50 µl pro Kavität einer Virus-Gebrauchsverdünnung mit einer Konzentration von 100 KID_{50} zugegeben und 1 Stunde mit den Verdünnungsstufen vorinkubiert. Das Antigen-Antikörper-Gemisch wurde auf die Zellen übertragen (100 µl/Kavität) und die Platten für weitere 48 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Bei jedem Test wurde eine Serumkontrolle (Serum/Kulturmedium), eine Zellkontrolle (Zellen/Kulturmedium) und ein Positivserum mitgeführt, sowie die Virus-Gebrauchsverdünnung rücktitriert. Nach zweitägiger Inkubationszeit wurde das Ergebnis lichtmikroskopisch anhand des typischen zytopathischen Effektes abgelesen. Als protektiv galt dasjenige Serum, bei dem der zytopathische Effekt vollständig unterdrückt worden war. Die Berechnung der Neutralisationstiter ist mit Hilfe der Methode nach Kaerber möglich (vgl. 3.2.2.5).

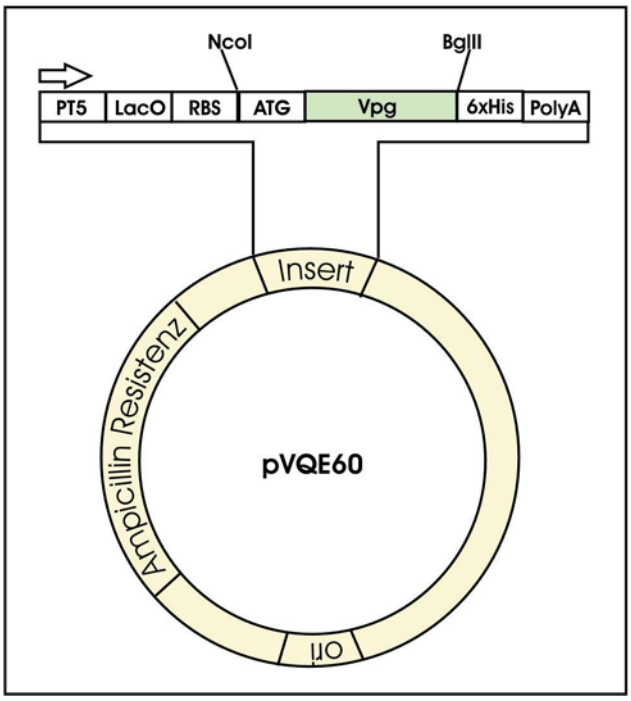
4 Ergebnisse

4.1 Prokaryotische Expression von Vpg

4.1.1 Klonierung von Vpg in pQE 60

Um die spätere Aufreinigung der rekombinanten Proteine zu vereinfachen, wurde das Qiaexpress-System (Fa. Qiagen) verwendet. Die in diesem System verwendeten Vektoren zeichnen sich durch ein optimiertes Promotor-Operator Element aus, welches die Expression der einklonierten Gensequenzen durch einfache Induktion mit IPTG ermöglicht. Das Vpg-Gen wurde in den Vektor pQE60 kloniert, um ein Fusionsprotein mit einer C-terminalen Hexa-His-Tag-Struktur zu entwickeln. Der His-Tag gewährleistete die Aufreinigung des Proteins nach der Expression (vgl. hierzu 3.2.5.1).
Zuerst wurde FCV-RNA durch Infektion von Fcwf- oder CRFK-Zellen mit FCV und anschließender Isolierung der RNA gewonnen. Mittels RT-PCR wurde dann eine cDNA-Kopie erstellt und das Vpg durch geeignete Primer (vgl. Tab. 4) in einer PCR amplifiziert. Um die spätere Klonierung zu ermöglichen wurden mit Hilfe der Primer Restriktionsschnittstellen für die Enzyme *Nco*I und *Bgl*II integriert. Bei der Auswahl der Primer wurde außerdem darauf geachtet, dass der C-terminale His-tag im Leserahmen bestehen blieb. Der amplifizierte Bereich erstreckte sich von nt 2900 bis nt 3232 des FCV-Genomes. Das PCR-Produkt (ca. 330 bp) und der Vektor pQE 60 wurden dann mit den Restriktionsenzymen *Nco*I und *Bgl*II verdaut und aufgereinigt. Insert und Vektor wurden anschließend in einem Kopienverhältnis von 1:4 vermischt und mit Hilfe einer Ligase miteinander verknüpft. Der Ligationsansatz wurde in den *E.coli*-Stamm M15 transformiert und anschließend positive Plasmidträger auf LB-Amp-Platten selektiert. Die Identifikation positiver Klone erfolgte durch Schnellpräparation. So stand für die prokaryotische Expression das Plasmid pVQE60 zur Verfügung (vgl. Abb. 7).

Abbildung 7: Schematische Darstellung des Plasmids pVQE60



PT5: T5-Promotor, **LacO**: lac operator, **RBS**: ribosome-binding site, **ATG**: Start Kodon, **6xHis**: 6x-His-Tag Sequenz, **PolyA**: Adenylatpolymer, **ori**: origin of replication

4.1.2 Prokaryotische Proteinexpression

Die plasmidtragenden Bakterien wurden gemäß Protokoll (vgl. 3.2.5.1) in LB-Medium vermehrt und die Proteinexpression mit IPTG induziert. Zur Kontrolle wurde der Verlauf der Expression untersucht, indem nach definierten zeitlichen Abständen Proben gezogen und in einer SDS-PAGE analysiert wurden (vgl. Abb. 9).

4.1.3 Proteinaufreinigung

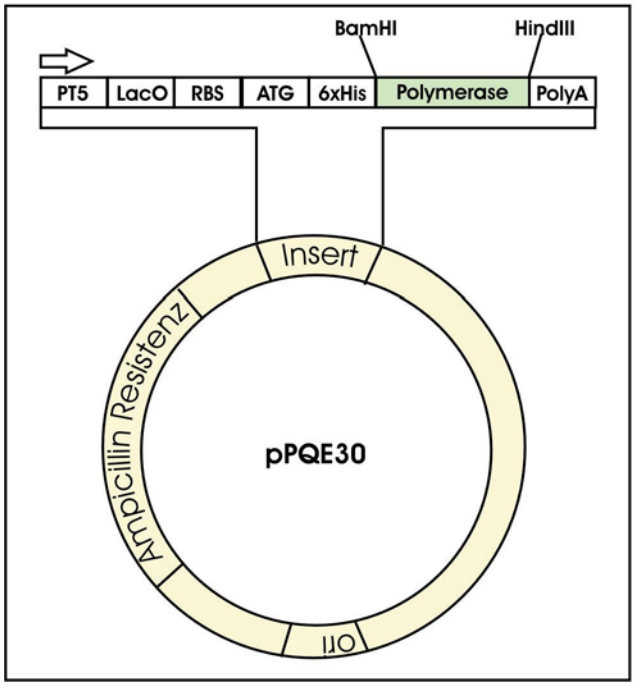
Das prokaryotisch exprimierte Vpg-Protein wurde durch eine Immobilized Metal Affinity Chromatographie (IMAC) gereinigt. Hierfür wurde das Talon® Resin (Fa.Clontech) verwendet und nach Protokoll verfahren (vgl. 3.2.5.2). Nach der Aufreinigung wurde das Eluat über Nacht dialysiert und so gereinigtes, denaturiertes Vpg in wässriger Lösung gewonnen. In einer SDS-PAGE wurden Aliquots der Waschschritte und des Vpg-haltigen Eluates untersucht, um den Erfolg der Aufreinigung zu kontrollieren (vgl. Abb. 10B).

4.2 Prokaryotische Expression der 3D-Polymerase

4.2.1 Klonierung der 3D-Polymerase in pQE 30

Die Klonierungsstrategie zur prokaryotischen Expression der 3D-Polymerase erfolgte in Analogie zur Vpg-Klonierung (vgl. 4.1.1). Hierfür wurde der Vektor pQE 30 (Fa. Qiagen) gewählt, bei dem die Hexa-His-Tag-Struktur N-terminal an die Polymerase geknüpft wurde. Die verwendeten Primer (vgl. Tab. 4) enthielten die Restriktionsschnittstellen für die Enzyme *Bam*HI und *Hind*III, die ebenfalls in der Multiple Cloning Site (MCS) des Vektors bestehen. Das generierte PCR-Produkt hatte eine Größe von etwa 1100 bp und entsprach dem Bereich von nt 4277 bis nt 5311 des FCV-Genomes. Als Endprodukt stand das Plasmid pPQE30 für die prokaryotische Expression zur Verfügung (vgl. Abb. 8).

Abbildung 8: Schematische Darstellung des Plasmids pPQE30



PT5: T5-Promotor, **LacO**: lac operator, **RBS**: ribosome-binding site, **ATG**: Start Kodon, **6xHis**: 6x-His-Tag Sequenz, **PolyA**: Adenylatpolymer, **ori**: origin of replication

4.2.2 Prokaryotische Proteinexpression

Die Expression der Polymerase erfolgte ebenfalls nach dem Standardprotokoll für das Qiaexpress-System (vgl. 3.2.5.1). Auch hier wurde zur Untersuchung der Expressionskinetik nach Induktion der zeitliche Verlauf in einer SDS-PAGE festgehalten (vgl. Abb. 9A).

Abbildung 9: Zeitlicher Verlauf der prokaryotischen Proteinexpression von Vpg und 3D-Polymerase

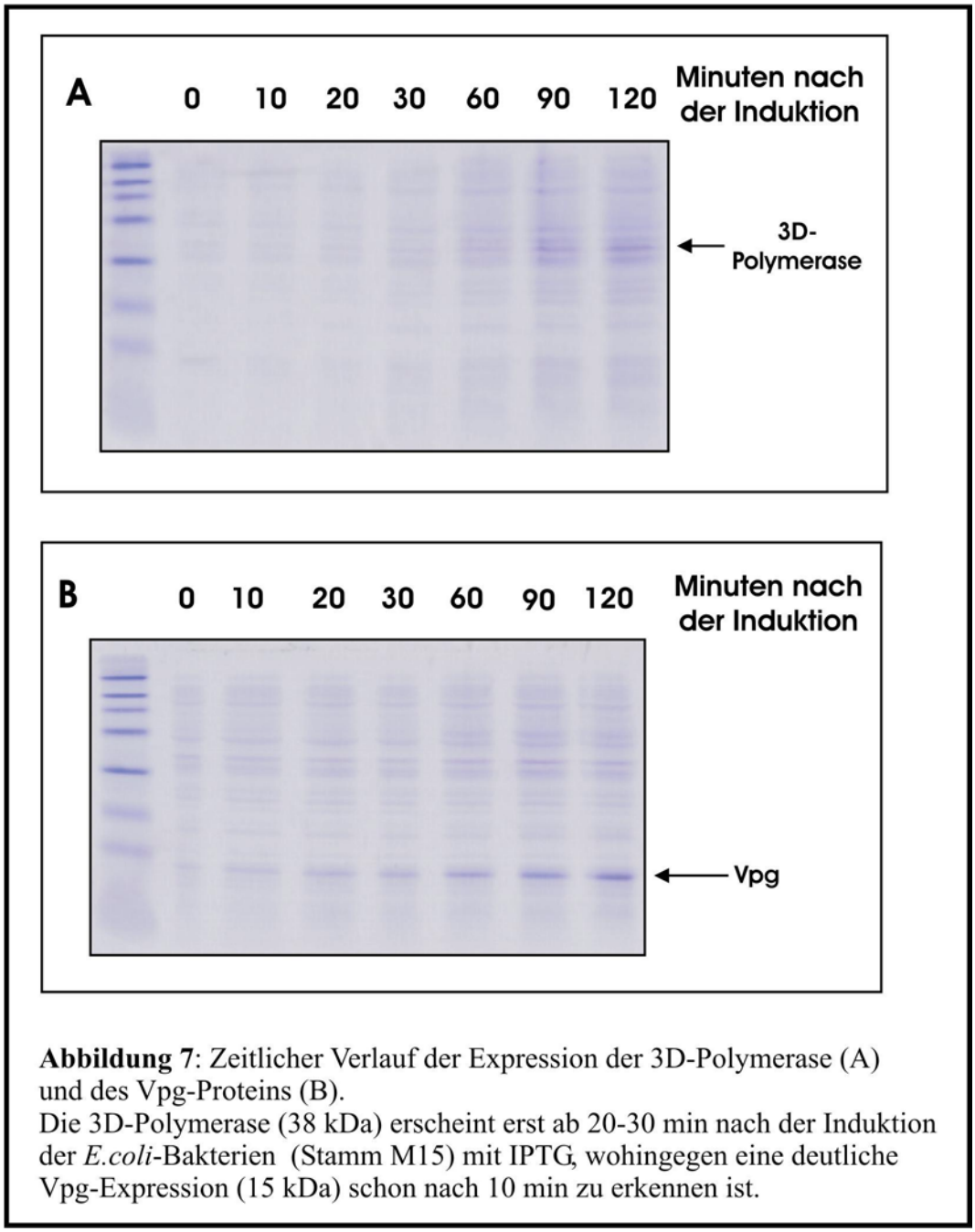
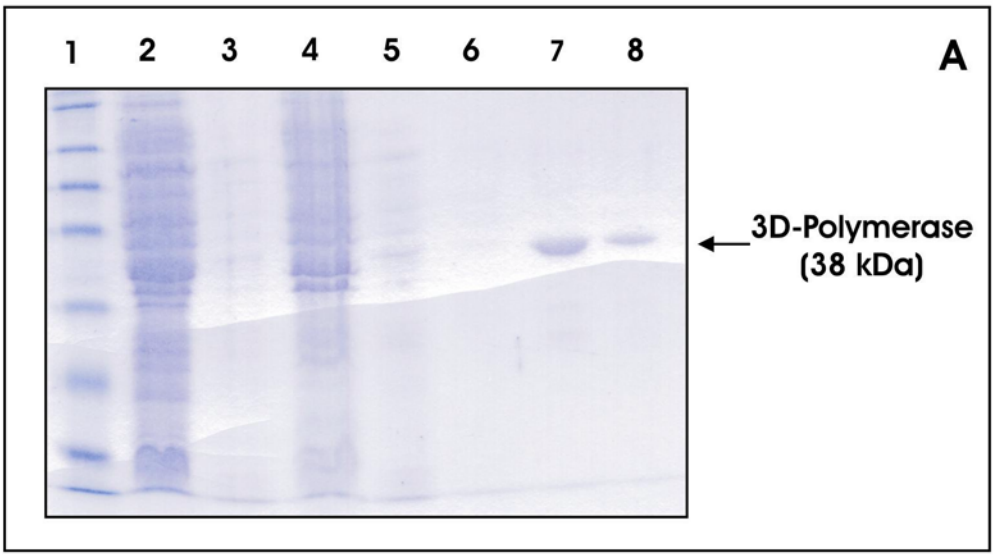


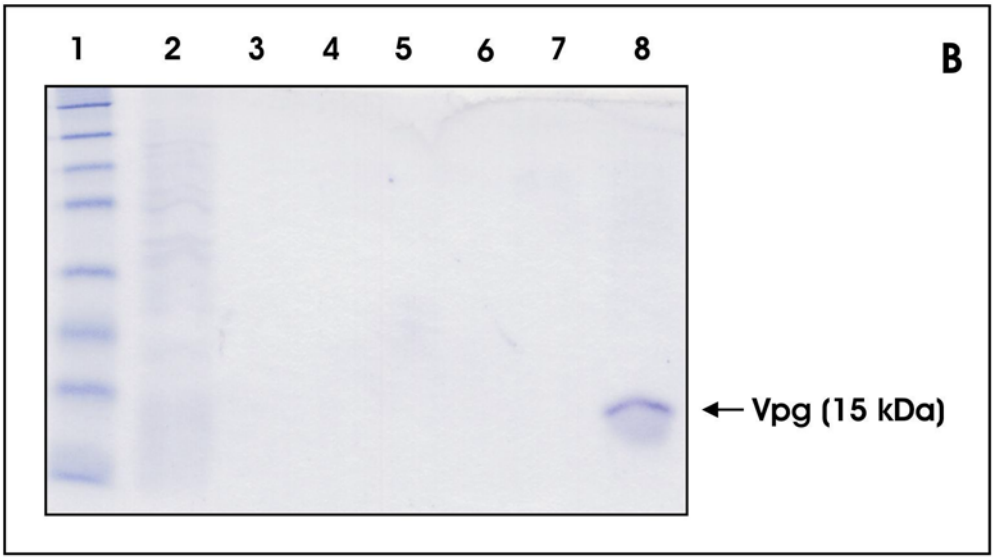
Abbildung 7: Zeitlicher Verlauf der Expression der 3D-Polymerase (A) und des Vpg-Proteins (B).
Die 3D-Polymerase (38 kDa) erscheint erst ab 20-30 min nach der Induktion der *E.coli*-Bakterien (Stamm M15) mit IPTG, wohingegen eine deutliche Vpg-Expression (15 kDa) schon nach 10 min zu erkennen ist.

4.2.3 Proteinaufreinigung

Analog zum Vpg-Protein wurde die Aufreinigung der Polymerase mit Talon® Metal Affinity Resin nach Protokoll (vgl. 3.2.5.2) durchgeführt. Nach Dialyse des Eluates wurde die Aufreinigung mittels SDS-PAGE überprüft (vgl. Abb. 10A).

Abbildung 10: Aufreinigung von Vpg und der 3D-Polymerase durch Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC)





SDS-PAGE der rekombinant exprimierten FCV-Proteine 3D-Polymerase (A) und Vpg (B) nach Säulenaufreinigung (1: Marker, 2: Rohlysat, 3-6/bzw. 7: Waschschritte, 7 bzw. 8: Eluate).

4.3 Eukaryotische Proteinexpression durch liposomale Transfektion

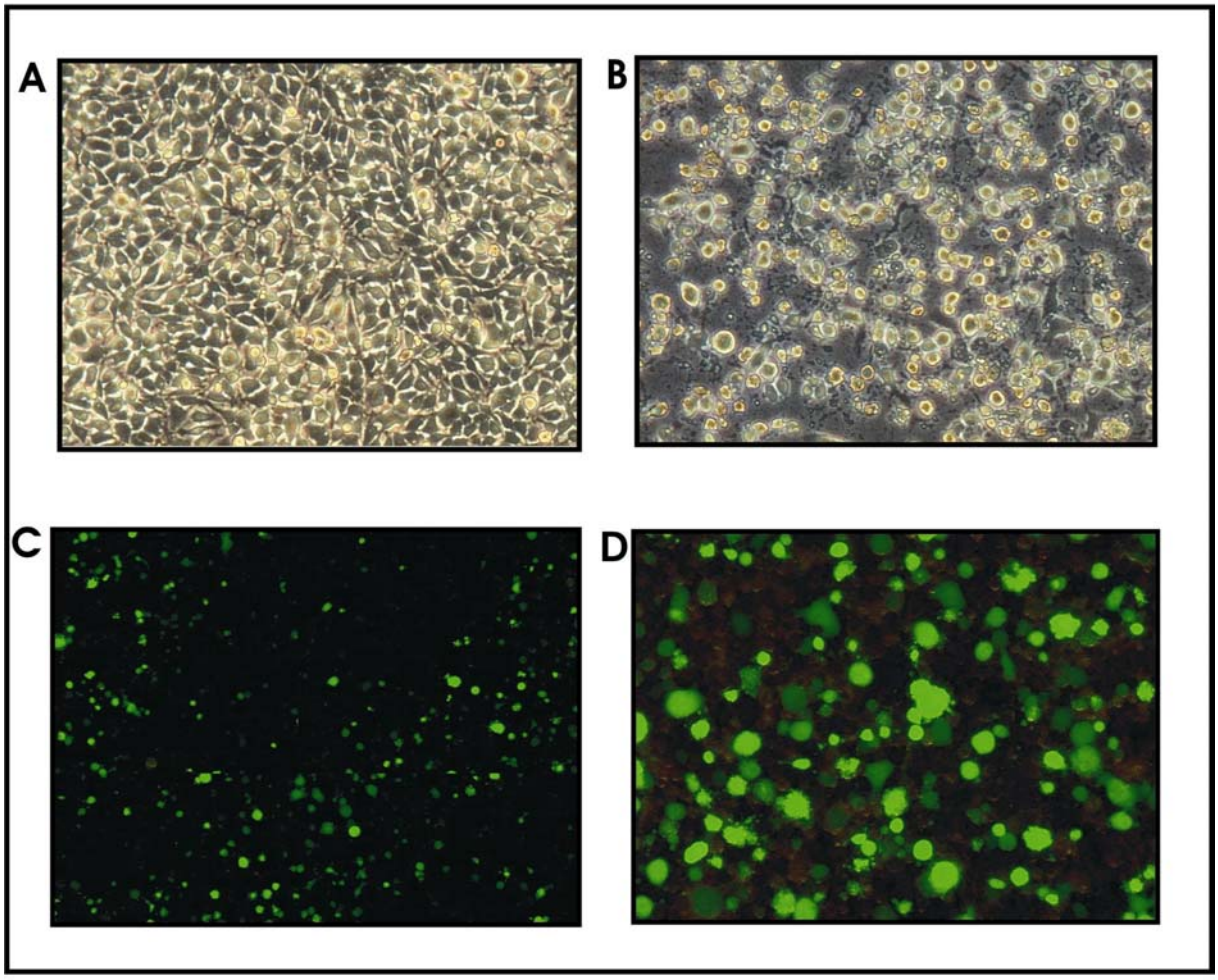
4.3.1 Optimierung des MVA/T7 Expressionssystem

Das rekombinante Vaccinia-Virus MVA/T7 (Modified Virus Ankara) enthält das stabil ins Genom integrierte Gen der RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7. Infiziert man eukaryotische Zellen mit dem MVA/T7-Virus, wird unter der Kontrolle des Vaccinia-7,5-Promotors die RNA-Polymerase exprimiert (vgl hierzu 3.2.2.4). Die Anwesenheit der T7-Polymerase ermöglicht eine zellkernunabhängige, zytoplasmatische Transkription rekombinanter Plasmide. Dazu müssen die gewünschten GOI (Gene of Interest) unter Kontrolle eines T7-Promotors gestellt werden. Zunächst aber sollte ein geeignetes System etabliert werden, das die transiente Expression größerer Mengen rekombinanter Proteine gewährleistet. Als Kontrollplasmid wurde pT7*GFP* verwendet, das freundlicherweise von Dr. Sutter (GSF München) zur Verfügung gestellt wurde. Es enthält die Sequenz eines grün fluoreszierenden Proteins (green fluorescent protein, *GFP*), das nach der Expression durch Anregung bei 488 nm mikroskopisch einfach nachzuweisen ist (vgl. hierzu 3.2.2.4). Nachdem verschiedene Zelllinien (CRFK, Fcwf, BSR-T7) und Transfektionssysteme (Kalziumphosphat, Liposomenkomplexe) in Kombination mit MVA/T7 untersucht worden waren, stellte sich die liposomale Transfektion von BSR-T7-Zellen als effektivste Methode heraus.

Als Transfektionsreagenz wurde Fugene6 (Fa. Roche) ausgewählt, da es sich durch hohe, reproduzierbare Transfektionseffizienz in BSR/T7-Zellen auszeichnete und nicht zytotoxisch auf die Zellen wirkte.

BSR/T7-Zellen besitzen eine T7-Polymerase, die stabil ins Wirtszellgenom integriert ist (vgl. 3.2.1.2). Bei Verwendung dieser Zelllinie konnte so bei zusätzlicher Infektion mit MVA/T7 die Expressionseffizienz deutlich gesteigert werden. Die Zellen waren besonders robust und zeigten eine längere Lebensdauer nach einer Infektion mit MVA/T7-Virus, so dass keine zeitliche Begrenzung der Expression rekombinanter Proteine zu befürchten war. Die optimierte MVA/T7-Expression wird durch Abbildung 11 veranschaulicht.

Abbildung 11: MVA/T7-Expressionssystem mit BSR-T7-Zellen



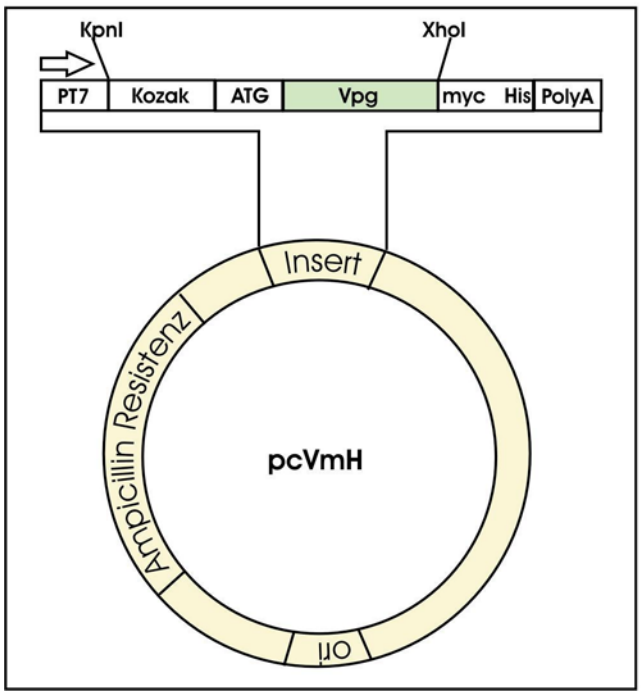
Darstellung der MVA/T7-Proteinexpression: liposomale Transfektion des Plasmids pT7GFP in BSR-T7-Zellen.
A: BSR-T7-Zellen (100% konfluent), mittlere Vergrößerung.
B: BSR-T7-Zellen nach MVA/T7-Infektion.
C: BSR-T7-Zellen 24 Stunden nach Transfektion von pT7GFP (Anregung bei 488 nm im Fluoreszenzmikroskop).
D: fluoreszierende Zellen in einer stärkeren Vergrößerung.

4.3.2 Eukaryotische Expression von Vpg

Prokaryotisch exprimierte Proteine eignen sich nicht für funktionelle Untersuchungen, da sie in denaturierter Form vorliegen. Außerdem sollte die Expression der Proteine dem natürlichen Replikationszyklus des FCV entsprechen. So wurden weitere Klonierungsschritte notwendig. Ferner mußte das Vpg für nachfolgende Experimente einerseits mit einer myc-Tag-Struktur verknüpft, andererseits ohne zusätzliche Strukturen exprimiert werden. Deshalb wurde Vpg in zwei weitere Vektoren kloniert.

4.3.2.1 Klonierung von Vpg in den Vektor pcDNA3.1myc/HisA+

Abbildung 12: Schematische Darstellung des Plasmids pcVmH



PT7: T7-Promotor, **Kozak**: Kozak-Sequenz (GCC(AG)CC), **ATG**: Start Kodon, **myc**: myc Epitope, **His**: 6xHis-Tag Sequenz, **PolyA**: Adenylatpolymer, **ori**: origin of replication

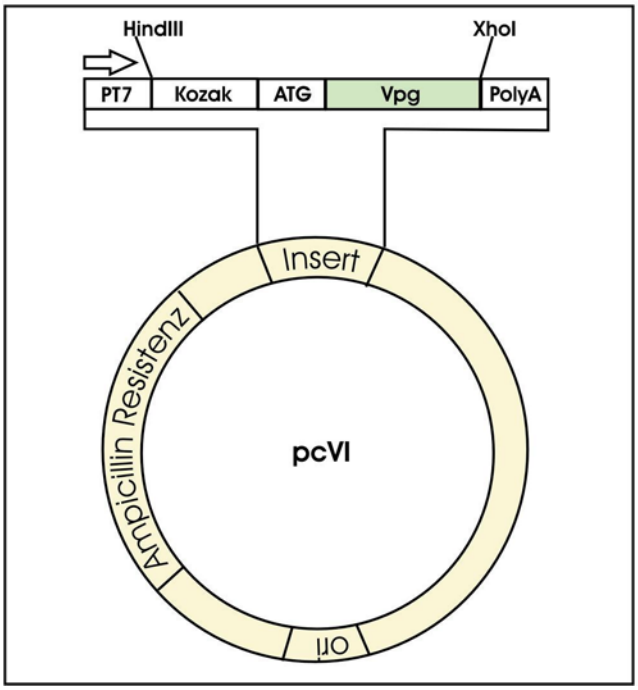
Im Vektor pcDNA3.1myc/HisA+ (Fa. Invitrogen) können Proteine mit einem myc/His-Tag carboxyterminal gekoppelt werden, mit dessen Hilfe weitere Untersuchungsschritte ermöglicht werden. Ein vor der multiple cloning site (MCS) liegender T7-Promotor gewährleistete eine zytoplasmatische Expression der gewünschten Proteine im MVA/T7-Expressionssystem.

Zunächst wurden Primer ausgewählt, die den Bereich von nt 2900 bis nt 3232 durch reverse Transkription von der FCV-RNA in cDNA umschrieben und anschließend in einer PCR amplifizierten. Ferner wurden die Restriktionsschnittstellen *Kpn*I und *Xho*I eingefügt, wobei darauf geachtet wurde, dass der myc/His-Tag im Leserahmen bestehen blieb. Um eine größtmögliche Translationseffizienz zu erreichen, wurde zusätzlich eine Kozak-Sequenz (GCC(AG)CCATG) (Kozak, 1987) vor der für Vpg-kodierenden Sequenz im sense Primer integriert (vgl. Tab. 5). Das so generierte PCR-Produkt wurde zuerst in den Vektor pCR2.1 (Fa. Invitrogen) in einem Kopienverhältnis von 4:1 ligiert, in *E.coli* Top10 Bakterien transformiert und auf LB-Z-Platten selektiert. Dabei wurde das sogenannte „blue white screening“ angewendet, um positive Plasmidträger zu erkennen (vgl. hierzu. 3.2.4.11). Die DNA wurde durch Schnellpräparation isoliert und mittels Restriktionsenzymverdau kontrolliert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA aus größeren Bakterienpräparationen

aufbereitet. So wurde sichergestellt, daß die Vpg-Sequenz in einem größeren Kopienverhältnis für die nachfolgende Ligation zur Verfügung stand, als das generierte Vpg-PCR-Produkt. Mit Hilfe der Restriktionsenzymschnittstellen wurde die Vpg-Sequenz wieder aus dem pCR2.1-Vektor geschnitten und in den mit den gleichen Enzymen vorbereiteten pcDNA3.1myc/HisA+-Vektor ligiert. Nach der Transformation in *E.coli* Top10F‘ Bakterien und anschließender Selektion auf LB-Amp-Platten, wurde der Klonierungserfolg erneut durch Schnellpräparation ermittelt. Für Folgeuntersuchungen wurde die Plasmid-DNA der positiven Klone mit einer Midi-Prep vorbereitet. Das so generierte Plasmid erhielt die Bezeichnung pcVmH (vgl. Abb. 12).

4.3.2.2 Klonierung von Vpg in den Vektor pcDNAI/Amp

Abbildung 13: Schematische Darstellung des Plasmids pcVI



PT7: T7-Promotor, **Kozak**: Kozak-Sequenz (GCC(AG)CC), **ATG**: Start Kodon, **PolyA**: Adenylatpolymer, **ori**: origin of replication

Der Vektor pcDNAI/Amp (Fa. Invitrogen) ist ein sicherer Expressionsvektor, der ebenfalls mit einem T7-Promotor ausgestattet ist. Zunächst mußte die Vpg-Sequenz in einen anderen Vektor einkloniert werden, da die Restriktionsschnittstelle *Kpn*I in pcDNAI/Amp nicht zur Verfügung stand. Die Nukleotide wurden mit den Enzymen *Kpn*I und *Xho*I aus pcDNA3.1myc/HisA+ herausgeschnitten und in den entsprechend vorbereiteten Vektor pcDNA3.1- (Fa. Invitrogen) ligiert. Transformation und Präparation erfolgten in Analogie zu den bereits beschriebenen Klonierungen. Aus dem so generierten rekombinanten Plasmid konnte die Vpg-Sequenz mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Hind*III und *Xho*I deletiert und in

pcDNAI/Amp inseriert werden. Nach Überprüfung des Klonierungserfolges wurden die Plasmide aus einer größeren Bakterienpräparation gewonnen. Für die nachfolgenden Untersuchungen stand somit das Plasmid pcVI zur Verfügung (vgl. Abb. 13).

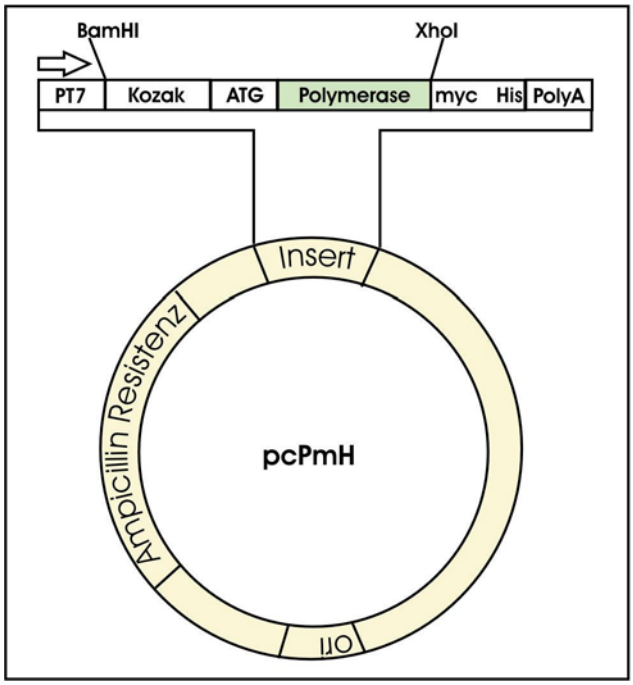
4.3.2.3 Proteinexpression

Die eukaryotische Expression des Vpg-Proteins aus den beiden Plasmidpräparationen (pcVmH und pcVI) erfolgte durch liposomale Transfektion von Zellen mit Fugene6-Reagenz (Fa. Roche), gemäß dem Protokoll für das MVA/T7-Expressionssystem (vgl. 3.2.3.2). In einer Western Blot-Analyse konnte das mit myc-Tag fusionierte Vpg mit Hilfe eines Antikörpers gegen Vpg nachgewiesen werden (zur Generierung des Antikörpers vgl. 4.4). Die erfolgreiche Expression von Vpg aus dem Vektor pcDNAI/Amp wurde ebenfalls mit dem Anti-Vpg-Antikörper bestätigt (vgl. Abb. 16). Das unterschiedliche Molekulargewicht von etwa 14 bis 15 und 19 kDa erklärt sich aus dem an das Vpg carboxyterminal verknüpften myc-Tag.

4.3.3 Eukaryotische Expression der 3D-Polymerase

Die 3D-Polymerase mußte ebenfalls für nachfolgende Versuche in zwei Vektoren kloniert werden. Das Vorgehen entsprach dem der Klonierungsschritte für das Vpg (vgl. 4.3.2.1 und 4.3.2.2).

Abbildung 14: Schematische Darstellung des Plasmids pcPmH



PT7: T7-Promotor, **Kozak**: Kozak-Sequenz (GCC(AG)CC), **ATG**: Start Kodon, **myc**: myc Epitope, **His**: 6xHis-Tag Sequenz, **PolyA**: Adenylatpolymer, **ori**: origin of replication

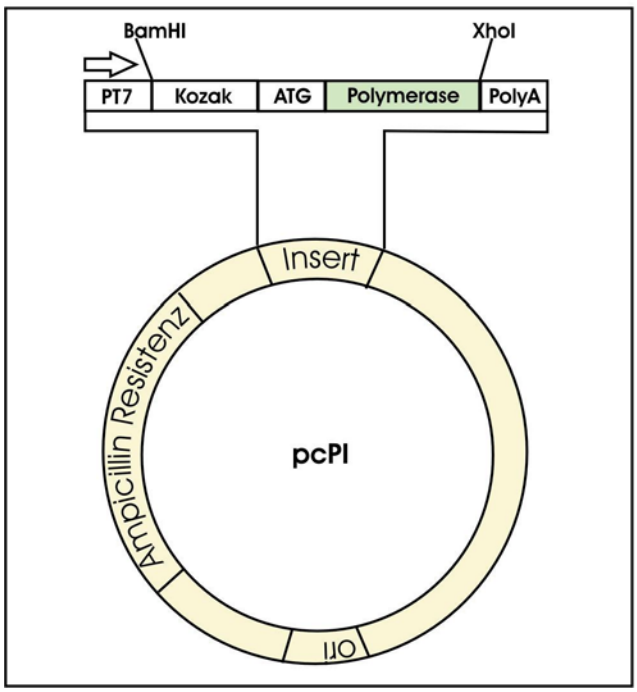
4.3.3.1 Klonierung der 3D-Polymerase in den Vektor pcDNA3.1myc/HisA+

Für die Klonierung der 3D-Polymerase in pcDNA3.1myc/HisA+ wurden Primer generiert, welche die Restriktionsschnittstellen für *Bam*HI und *Xho*I aufwiesen (vgl Tab. 5). Auch hier wurde im sense Primer eine Kozak-Sequenz eingefügt und darauf geachtet, daß der Leserahmen für den myc/His-Tag im c-terminalen Bereich nicht verschoben wurde. Das so generierte PCR-Produkt wies eine Größe von etwa 1100 bp auf. Die Klonierung erfolgte in Analogie zum Plasmid pcVmH (Vpg mit myc/His-Tag) (vgl. 4.3.2.1). Auch in diesem Fall war ein Zwischenschritt über den Vektor pCR2.1 nötig. Als Endprodukt stand das Plasmid pcPmH zur Verfügung, welches die Polymerase mit einem carboxyterminalen myc/His-Tag unter T7-Promotor-Kontrolle kodiert (vgl. Abb. 14).

4.3.3.2 Klonierung der 3D-Polymerase in den Vektor pcDNAI/Amp

Da der pcDNAI/Amp-Vektor bereits die Schnittstellen für *Bam*HI und *Xho*I in der MCS aufwies, konnte die Polymerase-Sequenz direkt aus dem pcDNA3.1myc/HisA+-Vektor geschnitten und in den vorbereiteten zweiten Vektor ligiert werden. Nach Transformation, Selektion und einer Midi-Prep der DNA aus Bakterien, konnte so das Plasmid pcPI gewonnen werden, welches die 3D-Polymerase des FCV unter T7-Promotor-Kontrolle stellte (vgl. Abb. 15).

Abbildung 15: Schematische Darstellung des Plasmids pcPI

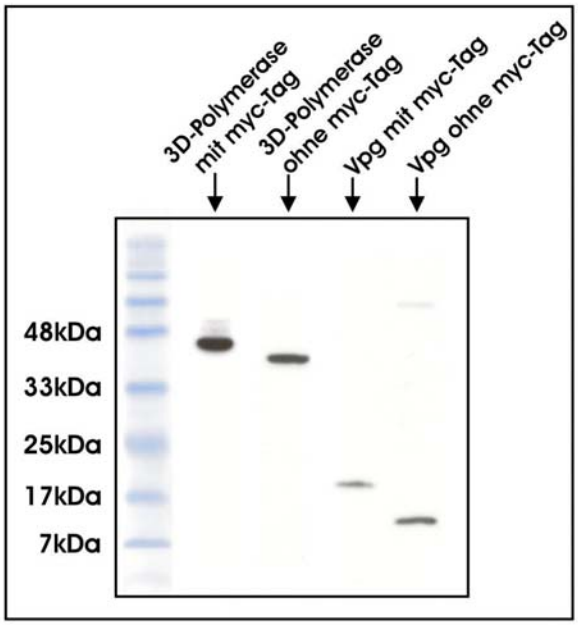


PT7: T7-Promotor, **Kozak**: Kozak-Sequenz (GCC(AG)CC), **ATG**: Start Kodon, **PolyA**: Adenylatpolymer, **ori**: origin of replication

4.3.3.3 Proteinexpression

In Analogie zur Proteinexpression von Vpg (vgl. 4.3.2.3) wurden auch die Plasmidpräparationen der 3D-Polymerase (pcPmH und pcPI) gemäß dem Protokoll für die MVA/T7-Expression liposomal in BSR-T7-Zellen transfiziert. Die erfolgreiche Expression wurde durch Western Blot dokumentiert (vgl. Abb. 16). Dabei konnten auch hier beide Polymerase-Proteine, gekoppelt und nicht gekoppelt, mit einem polyklonalen Anti-Polymerase-Kaninchenserum (vgl. 4.4) identifiziert werden. Ebenso wie beim Vpg fällt auch hier das größere Molekulargewicht der myc/His-Tag verknüpften Polymerase auf (ca. 38 kDa bzw. 45 kDa).

Abbildung 16: Eukaryotische Expression der rekombinanten 3D-Polymerase- und Vpg-Proteine



BSR-T7-Zellen wurden im MVA/T7-Expressionssystem mit den rekombinanten Plasmiden pcPmH, pcPI, pcVmH und pcVI transfiziert und nach 24 Stunden für die Western Blot-Analyse präpariert. Mit den spezifischen polyklonalen Kaninchenseren (Anti-Vpg- und Anti-Polymerase-AK) konnten so die Proteine Polymerase mit (pcPmH) und ohne (pcPI) myc-Tag, sowie das Vpg mit (pcVmH) und ohne (pcVI) myc-Tag nachgewiesen werden. Erwartungsgemäß waren das Vpg und die Polymerase mit myc-Tag größer (ca. 19 und 45 kDa) als die entsprechenden Proteine ohne (ca. 15 und 38 kDa).

4.3.4 Eukaryotische Expression des Kapsidproteins (ORF2) und des ORF3-Proteins

4.3.4.1 Plasmide und Antikörper

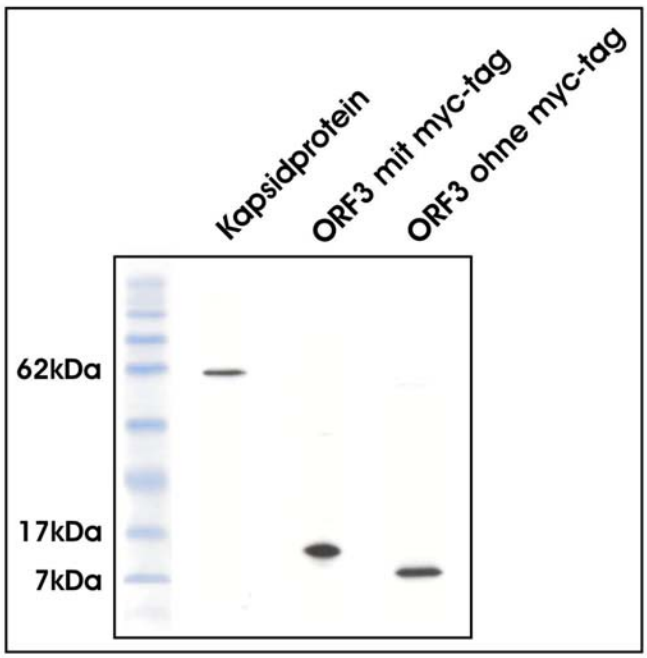
Das Kapsidprotein wird im zweiten offenen Leserahmen (ORF2) und das ORF3-Protein im dritten Leserahmen (ORF3) des FCV-Genoms kodiert. Im Verlauf des Replikationszyklus des FCV werden beide Proteine erst nach Synthese einer subgenomischen RNA, die als m-RNA für ORF2 und ORF3 dient, translatiert (vgl. 2.2.3).

Das Plasmid pCAPI stellt ein Genkonstrukt dar, welches für das reife Kapsidprotein des FCV ohne aminoterminale Domäne (Leadersequenz) kodiert (vgl hierzu 2.2.3). Es wurde bereits in einer vorangegangenen Arbeit kloniert (Geissler, 1998) und stand für die eukaryotische Expression zur Verfügung. Desweiteren konnte ein monoklonaler Antikörper gegen das ORF2 zur immunologischen Detektion verwendet werden (Schneider, 1999).
Das Plasmid pBEDNA3mH wurde freundlicherweise von Dr. Etschmann zur Verfügung. Es kodiert für das ORF3-Protein des FCV, wobei carboxyterminal ein myc/His-Tag durch Klonierung in den Vektor pcDNA3.1myc/HisA+ angefügt wurde. Aus der gleichen Arbeit stammte auch ein polyklonaler Antikörper gegen das ORF3, so dass das Protein immunologisch nachgewiesen werden konnte.

4.3.4.2 Proteinexpression

Analog zur eukaryotischen Expression von Vpg und der 3D-Polymerase (vgl. 4.3.2.3 und 4.3.3.3) wurden auch das Kapsid- und das ORF3-Protein gemäß dem Standardverfahren für das MVA/T7-Expressionssystem exprimiert. Im Western Blot konnten die beiden Proteine mit Hilfe der entsprechenden Antikörper nachgewiesen werden (vgl. Abb. 17).

Abbildung 17: Eukaryotische Expression der rekombinanten Kapsid (ORF2)- und ORF3-Proteine



BSR-T7-Zellen wurden mit den Plasmiden pCAPI und pBEDNA3mH transfiziert und für die Western Blot-Analyse präpariert.
Der immunologische Nachweis des reifen Kapsidproteins (62kDa) erfolgte mit einem monoklonalen Anti-ORF2-Antikörper.
Ein polyklonales Anti-ORF3-Antiserum detektierte das rekombinante ORF3-Protein mit myc-Tag (16kDa) und das ORF3-Protein (10kDa) einer mit FCV-infizierten Zellkontrolle.

4.4 Herstellung polyklonaler Antikörper

Funktionelle Untersuchungen und Translationsstudien von Vpg und der 3D-Polymerase im Replikationszyklus des FCV konnten nur mit Hilfe spezifischer Antikörper erreicht werden, welche die Nichtstrukturproteine zuverlässig nachwiesen. Durch Immunisierung von Kaninchen mit prokaryotisch exprimierten und aufgereinigten Vpg- und Polymerase-Proteinen wurde ein polyklonales Antiserum generiert und anschließend auf seine Spezifität getestet.

4.4.1 Polyklonale Antikörper gegen Vpg

4.4.1.1 Immunisierung der Kaninchen

Zwei vier Wochen alte, weibliche Kaninchen (Kunigunde (3) und Brunhilde (4)) wurden dreimal im Abstand von 3 Wochen intramuskulär mit 100-150 µg des gereinigten Proteins im Bereich des *M.quadriceps femoris* immunisiert. Dabei wurden die Proteinpräparationen für die Erstimmunisierung mit Freund Adjuvans complete (Fa. Sigma), für die nachfolgenden Immunisierungen mit Freund Adjuvans incomplete (Fa. Sigma) jeweils in einem Volumenverhältnis von 1:1 gemischt (vgl. 3.2.6.1).

4.4.1.2 Gewinnung der Anti-Vpg-Kaninchenseren

Den beiden Kaninchen wurden vor der ersten und jeweils 10 bis 14 Tage nach jeder weiteren Immunisierung etwa 5 ml Blut aus der Ohrvene entnommen. 21 Tage nach der dritten Boosterung wurden die Kaninchen euthanasiert und durch Herzpunktion entblutet. Die aus den Blutproben gewonnenen Seren wurden inaktiviert und auf ihre Spezifität getestet. (Vgl. hierzu 3.2.6.1)

4.4.1.3 Untersuchung der Anti-Vpg-Kaninchenseren

Die Kaninchenseren wurden im Western Blot sowohl auf die Anwesenheit Vpg-spezifischer Antikörper als auch deren Empfindlichkeit getestet. Zunächst wurden hierzu gereinigte Proteine durch eine SDS-PAGE aufgetrennt und gemäß dem Protokoll für Western Blots mit den Kaninchenseren inkubiert. Da das Standardprotokoll (vgl. 3.2.5.6) für die immunologische Detektion des Vpg-Proteins im Western Blot nicht optimal war, mußten verschiedene Kombinationen aus Serumverdünnungen und Inkubationszeiten versucht

werden. Eine Verlängerung der Inkubationszeit mit Blocking Puffer über Nacht erwies sich zur Blockierung unspezifischer Epitope als vorteilhaft. So konnte ein störender Hintergrund weitgehend vermieden werden. Die Inkubationszeit mit den Erstantikörpern (Kaninchenseren) wurde auf zwei Stunden verkürzt. Das Serum von Kaninchen 3 wurde dabei 1:3000, das von Kaninchen 4 1:4000 in Blocking Puffer verdünnt.
Detektierbare Antikörperreaktionen gegen Vpg zeigten sich bei beiden Kaninchen nach der 2. Immunisierung, verstärkten sich jedoch noch einmal nach der 3. Boosterung (vgl. Abb. 18). Somit standen zwei polyklonale Antiseren zur Verfügung, die sicher Vpg-Proteine immunologisch nachwiesen.

4.4.2 Polyklonale Antikörper gegen die 3D-Polymerase

4.4.2.1 Immunisierung der Kaninchen

Für die Generierung eines polyklonalen Antiserums gegen die 3D-Polymerase des FCV wurden ebenfalls zwei Kaninchen (Gunhilde (1) und Friedlinde (2)) immunisiert. In Analogie zur Immunisierung der Kaninchen mit Vpg-Proteinen (vgl. 4.4.1.1) wurde den vier Wochen alten, weiblichen Tieren die bakteriell exprimierte und aufgereinigte 3D-Polymerase intramuskulär injiziert. Dabei wurden ebenfalls 100-150 µg Protein pro Injektion eingesetzt und das gleiche Immunisierungsschema verwendet.

4.4.2.2 Gewinnung der Anti-3D-Pol-Antiseren

Auch zur Gewinnung der Antiseren gegen die 3D-Polymerase wurden den Kaninchen zunächst Blutproben aus der Ohrvene entnommen und die Tiere 21 Tage nach der letzten Boosterung entblutet (vgl. 3.2.6.1). Nach Inaktivierung der Seren wurden diese auf das Vorhandensein spezifischer Anti-3D-Pol-Antikörper getestet.

4.4.2.3 Untersuchung der Anti-3D-Pol-Antiseren

Wie schon bei der Untersuchung der Antiseren gegen das Vpg-Protein (vgl. 4.4.1.3) beschrieben, wurden auch die Seren der Kaninchen 1 und 2 auf Anwesenheit polyklonaler Antikörper untersucht, welche sich gegen die injizierte 3D-Polymerase richteten. Hierzu wurde ebenfalls gereinigtes Protein elektrophoretisch aufgetrennt und entsprechend dem Protokoll für Western Blots mit den Anti-Pol-Kaninchenseren inkubiert. Auch hier waren Modifikationen des Standardprotokolls nötig, um den Nachweis von Polymerase-Proteinen aus einer Präparation zu optimieren.

.

Nach Verlängerung der Inkubationszeit mit Blocking Puffer über Nacht wurde der Hintergrund deutlich reduziert. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit der Antikörper konnte die Inkubation mit dem Erstantikörper (Kaninchenseren) auf zwei Stunden verkürzt werden. Das Serum von Kaninchen 1 wurde hierbei 1:1000, das von Kaninchen 2 1: 3000 verdünnt.
Die Untersuchungen zeigten, dass das Kaninchen 2 bereits nach der 2., das Kaninchen 1 erst nach der 3. Impfung spezifische Antikörper gegen die Polymerase gebildet hatten, wobei bei Kaninchen 2 eine Steigerung nach der 3. Immunisierung deutlich wurde (vgl. Abb. 18).

4.5 Serumneutralisationstest

Enthält ein Serum neutralisierende Antikörper gegen ein Virus, so kann dieses an der Infektion von Zellen gehindert werden. Im Serumneutralisationstest sollten die generierten polyklonalen Antiseren auf Neutralisation von FCV untersucht werden.
Als Positivkontrolle diente ebenfalls ein Kaninchenserum, dessen polyklonale Antikörper gegen das Kapsidprotein gerichtet waren. Um unspezifische Reaktionen der Kaninchenseren mit den Zellen auszuschließen, wurde eine Serumkontrolle mitgeführt. Dabei wurde das zu testende Kaninchenserum ohne Virussuspension auf die Zellen gegeben. Die Virusgebrauchsverdünnung wurde bei jedem Test rücktitriert, um Titrationsfehler auszuschließen.

4.5.1 Serumneutralisationstest mit Anti-Vpg-Antiseren

Die Verdünnungsreihen der Seren von Kaninchen 3 und 4, sowie der Positivkontrolle, wurden zusammen mit der Virusgebrauchverdünnung eine Stunde vorinkubiert, um eine Bindung der Antikörper an die Viren zu ermöglichen. Dieses Antigen-Antikörper-Gemisch wurde auf Fcwf-Zellen übertragen und 48 Stunden inkubiert. In dieser Zeit konnten die Zellen durch nicht neutralisierte Viren infiziert werden. Bei allen Serumverdünnungsstufen von Kaninchen 3 und 4 zeigten die Fcwf-Zellen einen deutlichen zytopathischen Effekt, wohingegen das Serum der Positivkontrolle bis zu einer Verdünnung von 1:80 protektiv war (vgl. Abb. 19). Es konnte somit nicht gezeigt werden, dass das Vpg neutralisierende Antikörper induziert.

4.5.2 Serumneutralisationstest mit Anti-3D-Pol-Antiseren

Die Seren der Kaninchen 1 und 2 wurden ebenfalls auf Neutralisation von FCV im Zellkultursystem getestet. Dabei wurde in Analogie zum Serumneutralisationstest mit Anti-Vpg-Antiseren verfahren (vgl. 4.5.1). Bei keinem der geprüften Kaninchenseren war eine Neutralisation festzustellen (vgl. Abb. 19). Durch diese Untersuchung konnten somit keine neutralisierenden Antikörper nachgewiesen werden.

Abbildung 19: Serumneutralisationstest mit Anti-Polymerase- bzw. Anti-Vpg-Kaninchenseren gegen FCV

Seren	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240	Zellkontrolle
Kaninchen 1 (Gunhilde)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Kaninchen 2 (Friedlinde)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Kaninchen 3 (Kunigunde)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Kaninchen 4 (Brunhilde)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Positivkontrolle (Anti-FCV-Kaninchenserum)	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Serumkontrollen (Seren ohne FCV) Kan. 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kan. 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kan. 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kan. 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ = Zellen mit zytopathischen Effekt
- = Zellen ohne zytopathischen Effekt

Serumneutralisationstest zur Überprüfung einer Neutralisation von FCV durch die Kaninchenseren: Nach Zugabe des Antigen-Antikörper-Gemisches (FCV und Verdünnungsstufen der Kaninchenseren), wurden die Fcwf-Zellen 48 Stunden inkubiert und auf einen zytopathischen Effekt untersucht.
Weder die Anti-Polymerase-Seren (Kaninchen 1 und 2) noch die Anti-Vpg-Seren (Kaninchen 3 und 4) konnten eine Infektion der Zellen verhindern.
Das Anti-FCV-Kapsid-Kaninchenserum zeigte bis zu einer Serumverdünnung von 1:80 einen neutralisierenden Effekt auf das FCV.
Um unspezifische Reaktionen der Kaninchenseren auf die Fcwf-Zellen auszuschließen, wurden die Seren ohne FCV-Zugabe mit den Zellen inkubiert. Die Serumkontrollen zeigten keinen zytopathischen Effekt.

4.6 Untersuchung der Vpg- und 3D-Polymerase-Expression im Infektionsverlauf

Mit FCV infizierte Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten aufbereitet, um den zeitlichen Verlauf der Expression von Vpg und der 3D-Polymerase im Replikationszyklus des FCV und die Eignung der Kaninchenseren in einem *in vitro*-System zu untersuchen. Dabei kann der Zeitpunkt der Expression einen ersten Hinweis auf die mögliche Funktion eines viralen Proteins liefern. Die Expression der Nichtstrukturproteine wird typischerweise zu einem frühen Zeitpunkt im Replikationszyklus erwartet, da diese enzymatische oder regulative Funktionen erfüllen müssen. Strukturproteine erscheinen dagegen erst in einer späteren Phase.

4.6.1 Zeitlicher Verlauf der Expression von Vpg im Replikationszyklus von FCV

4.6.1.1 Untersuchung der Vpg-Expression im Western Blot

Um den Zeitpunkt der Expression von Vpg möglichst exakt zu ermitteln, wurden Fcwf-Zellen in einer 6-Loch-Platte ausgesät und mit FCV-KS20 infiziert. Es wurde hierfür eine moi von 10 gewählt und nicht-adsorbiertes Virus nach 15 Minuten durch zweimaliges Waschen entfernt. Die Zellen wurden im Abstand von je einer Stunde geerntet, in SDS-Probenpuffer lysiert und in einem Western Blot untersucht. Das Vpg-Protein wurde mit Hilfe der Anti-Vpg-Antiseren immunologisch nachgewiesen und so der Zeitpunkt der Expression bestimmt. Wie in der Abbildung 20 zu sehen ist, detektierte das Anti-Vpg-Kaninchenserum 4 Stunden nach der Infektion ein Protein mit der Größe von etwa 43 bis 45 kDa. Ab der 6. Stunde *p.i.* akkumulierten ein 25 kDa und ein 14 bis 15 kDa großes Protein. In diesem System ist freies Vpg somit erst ab der 6. bzw. 7. Stunde *p.i.* nachzuweisen.

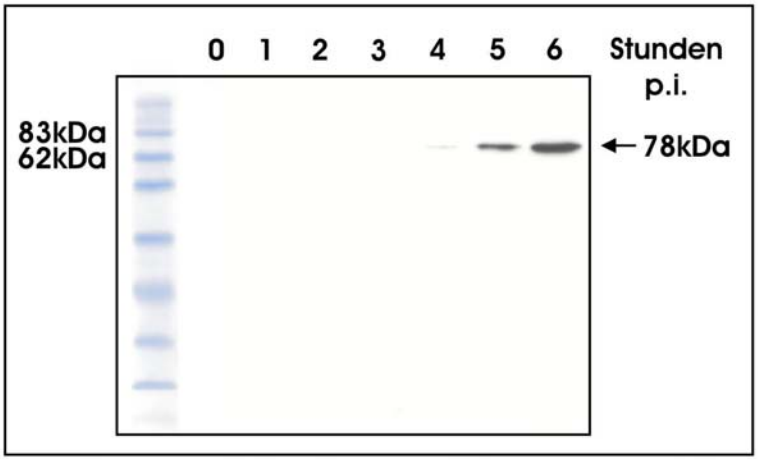
4.6.1.2 Untersuchung der Vpg-Expression durch indirekte Immunfluoreszenz

Der Infektionsverlauf wurde zusätzlich durch eine indirekte Immunfluoreszenz untersucht. Hierfür wurden Fcwf-Zellen in einer 6-Loch-Platte ausgesät und mit FCV-KS20 (moi 10) infiziert. Nicht-adsorbiertes Virus wurde nach 15 Minuten durch zweimaliges Waschen entfernt und die Infektion im Abstand von jeweils einer Stunde durch Fixierung der Zellen gestoppt. Die Zellen wurden gemäß dem Protokoll für die indirekte Immunfluoreszenz behandelt und das Ergebnis im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet (vgl. 3.2.5.7). Nach 2

Stunden *p.i.* wurde eine grüne Fluoreszenz radial um den Kern sichtbar und zeigte den Beginn der Vpg-Expression an. Ein zytopathischer Effekt war nach etwa 4 Stunden durch eine deutliche Abkugelung der Zellen und Lösung aus dem Zellverband zu erkennen. Vor allem in diesen Zellen zeigte sich eine starke Fluoreszenz im gesamten Zytoplasmabereich (vgl. Abb. 21).

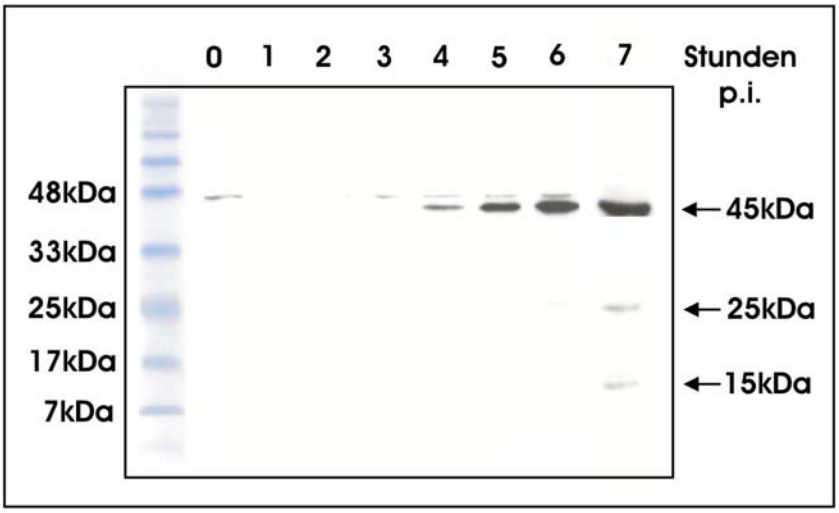
Abbildung 20: Untersuchung der zeitlichen Expression der 3D-Polymerase und des Vpg-Proteins im Replikationszyklus des FCV durch Western Blot-Analyse

A: Zeitlicher Verlauf der 3D-Polymerase Expression



Fcwf-Zellen wurden mit FCV infiziert und im Abstand von einer Stunde für die Western Blot-Analyse präpariert. Nach 4 Stunden konnte das 3CD-Vorläuferprotein (78kDa) als schwache Bande detektiert werden, welches im weiteren Verlauf der Infektion akkumulierte. Freie Polymerase konnte in diesem System nicht nachgewiesen werden.

B: Zeitlicher Verlauf der Vpg Expression



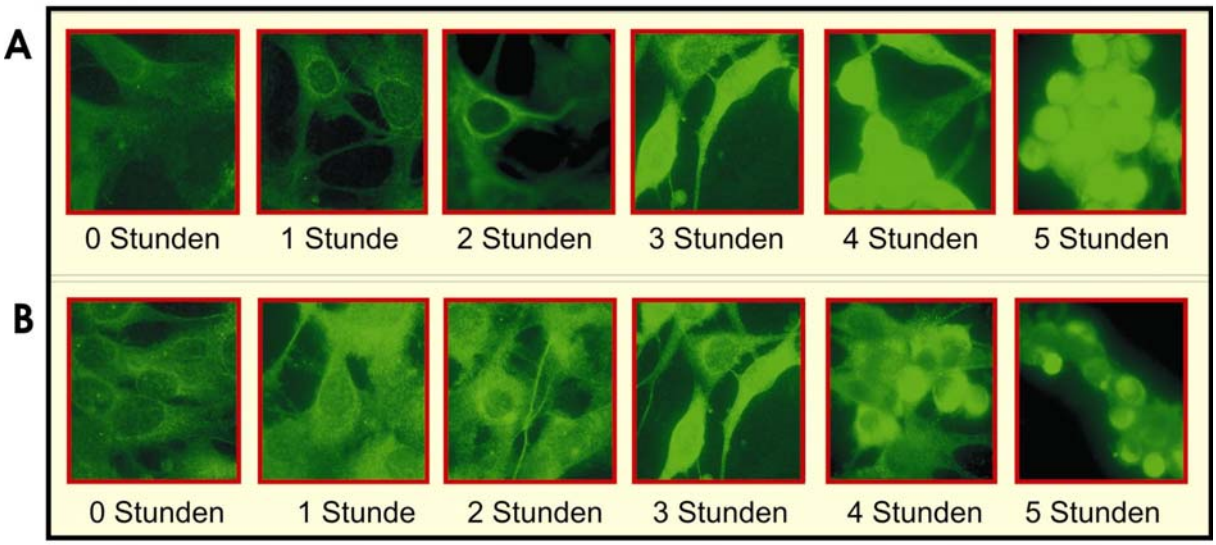
In Analogie zu den Ergebnissen des 3D-Polymerase Time Course waren auch in diesem Western Blot immunreaktive Proteine ab 4 Stunden p.i. detektierbar. Diese zeigten eine Größe von 45kDa (4 Stunden p.i.), 25kDa (6 Stunden p.i.) und 15kDa (6 Stunden p.i.). Freies Vpg (15kDa) liegt somit erst mit deutlicher zeitlicher Verzögerung vor.

4.6.2 Zeitlicher Verlauf der Expression der 3D-Polymerase im Replikationszyklus von FCV

4.6.2.1 Untersuchung der 3D-Pol-Expression im Western Blot

Zur Untersuchung des Expressionszeitpunktes der 3D-Polymerase wurden ebenfalls mit FCV infizierte Fcwf-Zellen zu definierten Zeitpunkten geerntet und in einem Western Blot analysiert (vgl. hierzu 4.6.1.1). Ab der 4. Stunde nach der Infektion akkumulierte ein etwa 78 kDa großes Protein. Hierbei handelt es sich um das 3CD-Vorläuferprotein. In diesem System konnte keine freie 3D-Polymerase festgestellt werden. Das Ergebnis ist der Abbildung 20 zu entnehmen.

Abbildung 21: Untersuchung der zeitlichen Expression der 3D-Polymerase und des Vpg-Proteins im Replikationszyklus des FCV durch indirekte Immunfluoreszenz



A: Indirekte Immunfluoreszenz gegen die FCV-3D-Polymerase mit polyklonalem Antiserum.
B: Indirekte Immunfluoreszenz gegen das FCV-Vpg mit polyklonalem Antiserum.

Zwei Stunden nach der Infektion von Fcwf-Zellen mit FCV war eine beginnende Expression von Vpg und der 3D-Polymerase im Zytoplasma an radial um den Kern organisierten fluoreszierenden Zonen zu erkennen. In den nachfolgenden Stunden zeigten die Zellen einen immer deutlicheren zytopathischen Effekt. Die abgekugelten Zellen wiesen eine vollständige Fluoreszenz im gesamten Zytoplasmabereich auf.

4.6.2.2 Untersuchung der 3D-Pol-Expression durch indirekte Immunfluoreszenz

Zum Nachweis der 3D-Polymerase im Replikationszyklus des FCV durch indirekte Immunfluoreszenz, wurde die gleiche Versuchsanordnung angewendet, wie bereits in Punkt 4.6.1.2 beschrieben. Auch hier zeigte eine deutliche grüne Fluoreszenz im Zytpolasma der

Zellen eine Expression der 3D-Polymerase, bzw. ihres Vorläuferproteins, ab der 2. Stunde *p.i.* an (vgl. Abb. 21).

4.7 Untersuchung einer Interaktion zwischen Nichtstruktur- und Strukturproteinen des FCV

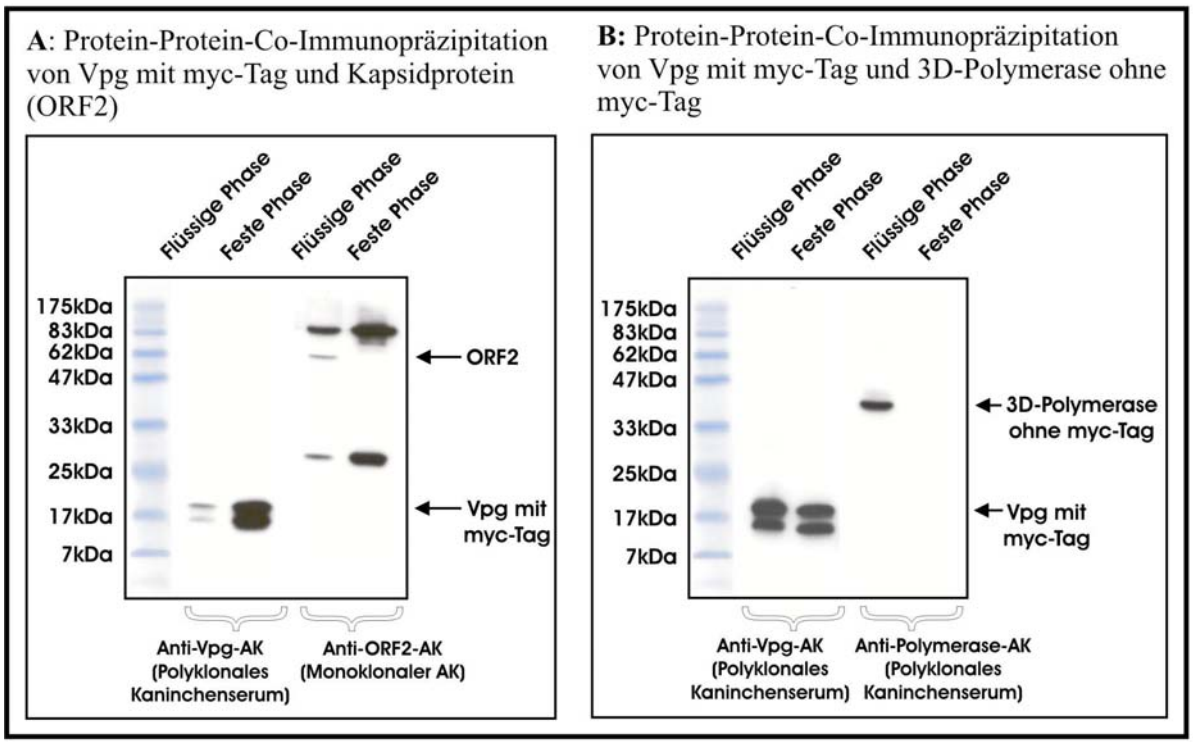
Mit Hilfe einer Protein-Protein-Co-Immunopräzipitation sollten potentielle Interaktionen zwischen bestimmten Proteinen des FCV untersucht werden, um weitere mögliche Funktionen der beteiligten Proteine zu ermitteln. Dazu war es zunächst notwendig, die gewünschten Proteine im MVA/T7-Expressionssystem so zu exprimieren, dass eines der Proteine als Köderprotein (mit myc-Tag), das andere als Zielprotein (ohne myc-Tag) vorlag. Die transfizierten Zellen wurden entsprechend dem Protokoll für die Protein-Protein-Co-Immunopräzipitation lysiert und die so gewonnen proteinhaltigen Zelllysate weiterverarbeitet.

4.7.1 Untersuchung einer Interaktion von Vpg und ORF2

Für diese Untersuchung wurde das Vpg als Köderprotein verwendet. Dazu wurde das Plasmid pcVmH in BSR-T7-Zellen transfiziert und so das Vpg-Protein mit einem myc-Tag exprimiert. Das Kapsidprotein (ORF2) stellte in diesem System das Zielprotein dar, welches durch Transfektion des Plasmids pCAPI gebildet wurde. Nachdem eine Interaktion der beiden Reaktionspartner ermöglicht worden war, wurde das Köderprotein mit einem Anti-myc-Antikörper immunopräzipitiert. Nach der Durchführung der Protein-Protein-Co-Immunopräzipitation (siehe Standarprotokoll 3.2.5.8) musste zunächst nachgewiesen werden, dass alle Komponenten im Reaktionsansatz vorhanden waren. Dazu wurden die flüssige und die feste Phase des Systems für eine Western Blot-Analyse präpariert und die Reaktionspartner mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert. Hierfür wurde zum Nachweis von Vpg ein polyklonales Kaninchenserum, zur Detektion von ORF2 ein monoklonaler Antikörper verwendet. Beide Proteine, Vpg und das Kapsidprotein, wurden in der flüssigen Phase bestätigt, so dass die Proteine für eine mögliche Interaktion zur Verfügung standen. Der Erfolg der Immunopräzipitation konnte durch Nachweis des Köderproteins (Vpg) in der festen Phase (Präzipitat) gezeigt werden. Im Falle einer Interaktion von Vpg und Kapsidprotein sollte auch das Zielprotein im Präzipitat nachweisbar sein. Da ORF2 nicht in der festen Phase detektiert werden konnte, besteht keine Vpg-Kapsidprotein-Interaktion, die durch eine Protein-Protein-Co-Immunopräzipitation festgestellt werden kann (vgl. Abb. 22A).

.

Abbildung 22: Untersuchung einer Protein-Protein-Interaktion zwischen Vpg und ORF2 sowie zwischen Vpg und der 3D-Polymerase



Zur Untersuchung einer potentiellen Interaktion zwischen bestimmten FCV-Proteinen wurde eine Protein-Protein-Co-Immunopräzipitation angewendet. Die hierfür benötigten Proteine wurden mit Hilfe des MVA/T7-Expressionssystems in BSR-T7-Zellen exprimiert. Die immunologische Detektion erfolgte durch polyklonale bzw. monoklonale Antikörper gegen die jeweiligen Proteine, wobei auch unspezifische Reaktionen zu beobachten waren. Diese traten vor allem bei Verwendung des monoklonalen Anti-ORF2-Antikörpers auf und stellen Reaktionen mit dem in der Präzipitation eingesetzten Anti-myc-Antikörpers dar. Sie haben für das Ergebnis keine Bedeutung.
A: Das eukaryotisch exprimierte Vpg mit myc-Tag stellte in diesem System das Köderprotein dar und konnte mit einem Anti-myc-Antikörper immunopräzipitiert und somit in der flüssigen als auch in der festen Phase nachgewiesen werden. Das Kapsidprotein (ORF2) als Zielprotein sollte im Fall einer Interaktion zwischen den beiden Proteinen ebenfalls in beiden Phasen detektiert werden können. Das ORF2 war jedoch in der festen Phase nicht nachzuweisen, so dass in diesem System keine Interaktion zwischen Vpg und ORF2 festgestellt werden kann.
B: Um eine mögliche Interaktion zwischen Vpg und der 3D-Polymerase zu untersuchen, wurde auch hier das Vpg mit myc-Tag als Köderprotein verwendet. Die erfolgreiche Immunpräzipitation von Vpg mit einem Anti-myc-Antikörper konnte durch den Nachweis des Proteins in der festen Phase gezeigt werden. Die 3D-Polymerase war nur in der flüssigen Phase nachzuweisen. Es besteht keine Interaktion zwischen dem Vpg und der 3D-Polymerase, die in einer Protein-Protein-Co-Immunopräzipitation nachzuweisen ist.

4.7.2 Untersuchung einer Interaktion von Vpg und 3D-Polymerase

Zur Untersuchung einer potentiellen Interaktion zwischen Vpg und der 3D-Polymerase wurde ebenfalls das Vpg-Protein mit myc-Tag exprimiert und als Köderprotein verwendet. Zur Expression der 3D-Polymerase ohne myc-Tag wurde das Plasmid pcPI in BSR-T7-Zellen transfiziert. Die Durchführung des Versuches verlief analog zur bereits besprochenen Protein-

Protein-Co-Immunopräzipitation von Vpg und ORF2 (vgl. 4.7.1). Der Nachweis der beiden Proteine in der flüssigen Phase erfolgte im Western Blot mit Hilfe von Kaninchen-Antiseren gegen Vpg und die 3D-Polymerase. Die erfolgreiche Immunpräzipitation von Vpg mit einem Anti-myc-Antikörper konnte durch Detektion des Vpg in der festen Phase gezeigt werden. Alle Komponenten standen somit für eine Interaktion der beiden Proteine zur Verfügung. Die 3D-Polymerase war im Präzipitat allerdings nicht nachzuweisen, so dass keine Vpg-3D-Polymerase-Interaktion anzunehmen ist, die in einer Protein-Protein-Co-Immunopräzipitation festgestellt werden kann (vgl. Abb. 22B).

Zur Vervollständigung des Systems wurden die nachfolgenden Untersuchungen zu möglichen Interaktionen zwischen verschiedenen FCV-Proteinen mit Hilfe von Protein-Protein-Co-Immunopräzipitationen durchgeführt.

4.7.3 Untersuchung einer Interaktion von 3D-Polymerase und ORF2

Die Plasmide pcPmH und pCAPI wurden in BSR-T7-Zellen mit Hilfe des MVA/T7-Expressionssystems transfiziert. Die 3D-Polymerase wurde so mit einem carboxyterminalen myc-Tag exprimert und als Köderprotein verwendet. Das Kapsidprotein stellte in diesem System das Zielprotein dar. Nach der Durchführung der Protein-Protein-Co-Immunopräzipitation wurden die feste und die flüssige Phase im Western Blot analysiert (vgl. Abb. 23C). Es wurde ein polyklonales Anti-Polymerase-Kaninchenserum und ein monoklonaler Anti-ORF2-Antikörper verwendet. Das Köderprotein war in beiden Phasen nachweisbar und bestätigte so die erfolgreiche Expression und Immunopräzipitaion der 3D-Polymerase. Das Kapsidprotein wurde nur in der flüssigen Phase detektiert, so dass keine Polymerase-Kapsidprotein-Interaktion in einer Protein-Protein-Co-Immunopräzipitation nachweisbar ist.

.

4.7.4 Untersuchung einer Interaktion von ORF3 und Vpg

Das eukaryotisch exprimierte ORF3 mit myc-Tag stellte in diesem System das Köderprotein dar. Hierfür wurde das Plasmid pBEDNA3mH in BSR-T7-Zellen transfiziert. Um das Vpg ohne myc-Tag zu erhalten, wurde das Plasmid pcVI für die Transfektion verwendet. In Analogie zu den bereits beschriebenen Versuchen, wurde auch hier eine Protein-Protein-Co-Immunopräzipitation durchgeführt (vgl. Abb. 23D). Beide Proteine konnten in der flüssigen Phase mit spezifischen Anti-ORF3- bzw. Anti-Vpg-Kaninchenseren nachgewiesen werden. ORF3 konnte auch in der festen Phase detektiert werden und bestätigte eine erfolgreiche Immunopräzipitation. Das Vpg-Protein war im Präzipitat nicht nachweisbar. Es besteht somit keine Interaktion zwischen ORF3 und Vpg, die in einer Protein-Protein-Co-Immunopräzipitation festgestellt werden kann.

4.7.5 Untersuchung einer Interaktion von ORF3 und 3D-Polymerase

Auch in diesem Versuch wurde das ORF3-Protein als Köderprotein verwendet und nach Transfektion von pBEDNA3mH mit einem myc-Tag exprimiert. Zur Expression der 3D-Polymerase wurde das Plasmid pcPI transfiziert. Nach der Protein-Protein-Co-Immunopräzipitation waren sowohl das ORF3-Protein als auch die 3D-Polymerase im Western Blot in der flüssigen Phase nachweisbar und dienten so als Expressionskontrolle. Im Gegensatz zu ORF3 erschien die 3D-Polymerase allerdings nicht in der Analyse der festen Phase (vgl. Abb. 23E). Das Ergebnis beweist, dass keine Interaktion zwischen ORF3 und der 3D-Polymerase besteht, die in einer Protein-Protein-Co-Immunopräzipitation nachzuweisen ist.

5 Diskussion

5.1 Aufgabenstellung und Arbeitsplan

Ziel der vorliegenden Arbeit war, einen Beitrag zur funktionellen Charakterisierung des Vpg-Proteins und der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (3D-Polymerase) des Felinen Calicivirus zu leisten. Vor allem sollte untersucht werden, ob dem Vpg bei der Transkription der viralen RNA eine Rolle zukommt und ob das calicivirale Vpg möglicherweise an einer Enkapsidierung der genomischen und subgenomischen RNA beteiligt ist.

Dazu war es zunächst notwendig das Vpg und die 3D-Polymerase prokaryotisch zu exprimieren und aufzureinigen. Mit Hilfe der beiden gereinigten Proteine wurden polyklonale Antikörper durch Immunisierung von Kaninchen gewonnen, welche eine sichere immunologische Detektion der Proteine gewährleisteten.

Zur Charakterisierung der beiden Nichtstrukturproteine wurden das Vpg und die 3D-Polymerase hinsichtlich ihrer zeitlichen Expression innerhalb des Replikationszyklus von FCV im Zellkultursystem untersucht. Zum einen wurde die Expression der Proteine nach Transfektion rekombinanter Vpg- und Polymerase-Gene in eukaryotische Zellen durch Western Blot analysiert. Außerdem wurden die beiden Proteine nach Infektion feliner Zellen mit FCV im Western Blot und durch Immunfluoreszenzuntersuchungen nachgewiesen. Eine antigenetische Untersuchung des Vpg und der 3D-Polymerase erfolgte durch einen Serumneutralisationstest. Mögliche Interaktionen zwischen verschiedenen Proteinen des FCV wurden mit Hilfe einer Protein-Protein-Co-Immunopräzipitation untersucht. Im Hinblick auf die Theorien zu möglichen Funktionen des Vpg, standen vor allem potentielle Interaktionen zwischen Vpg und der 3D-Polymerase, sowie zwischen Vpg und dem Kapsidprotein im Vordergrund.

5.2 Herstellung der Hilfsmittel zur Charakterisierung von Vpg und der 3D-Polymerase

5.2.1 Prokaryotische Expression und Aufreinigung des Vpg-Proteins und der 3D-Polymerase

Die prokaryotische Expression und die daran anschließende Aufreinigung des Vpg-Proteins und der 3D-Polymerase erfolgte in einer Kombination des QiaExpress® Systems (vgl. 3.2.5.1) mit einer Talon® Metallchelat-Affinitätschromatographie (IMAC) (vgl. 3.2.5.2).
Die bakterielle Expression rekombinanter Proteine ermöglicht die Produktion größerer Proteinmengen und erleichtert deren Aufreinigung durch Fusion mit einem Hexa-Histidinrest (His-Tag). Dabei ist allerdings zu beachten, dass der His-Tag möglicherweise mit dem rekombinanten Protein interagiert und eine effiziente Aufreinigung daher häufig unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt werden muss. Konformationsabhängige Untersuchungen sind daher nicht mehr möglich. Ferner fehlen bei der Expression im prokaryotischen System posttranslationale Modifikationen der Proteine. Der Vorteil der angewandten Methode liegt darin, dass sie zur Expression unterschiedlichster Proteine verwendet werden kann. Zusätzlich ist der His-Tag nur gering immunogen, so dass das rekombinante Protein auch ohne Entfernung des Tags zur Antikörpergenerierung genutzt werden kann. Die Verwendung des Talon®Resin zur Aufreinigung der Proteine erwies sich als kompatibel mit dem zuvor verwendetem QiaExpress® System. Außerdem konnte durch Verwendung dieser Aufreinigungsmethode die Ausbeute an rekombinantem Protein gesteigert werden.

5.2.2 Polyklonale Antikörper gegen das Vpg und die 3D-Polymerase

Zum Nachweis der nativ exprimierten Proteine mußten spezifische Antikörper hergestellt werden, die sicher das Vpg und die 3D-Polymerase detektierten. Zu diesem Zweck wurden polyklonale Antikörper durch Immunisierung von Kaninchen mit den prokaryotisch exprimierten Proteinen generiert. In Studien anderer Arbeitsgruppen sind bereits polyklonale Antikörper gegen das Vpg und die 3D-Polymerase eingesetzt worden, wobei in diesen Arbeiten unterschiedliche Verfahren bzw. Antigene verwendet wurden. So wurde ein Anti-Vpg-Serum gegen ein synthetisch generiertes Vpg-Peptid (Sosnovtsev *et al.*, 2002) und ein

Anti-Pro-Pol-Serum hergestellt, welches nicht nur die 3D-Polymerase, sondern auch einen größeren antigenen Bereich des Felinen Calicivirus einschließlich der 3C-Protease abdeckte (Sosnovtseva *et al.*, 1999). In der vorliegenden Arbeit wurden die mit dem Vpg und der 3D-Polymerase korrespondierenden Genabschnitte des Virusisolates FCV-KS20 durch eine RT-PCR und anschließender PCR amplifiziert. Dabei wurde darauf geachtet, keine zusätzlichen Sequenzen mit einzubeziehen, um mögliche Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen auszuschließen. Die Kaninchenseren wurden hinsichtlich ihrer Spezifität und Empfindlichkeit getestet. Nach Auftrennung sowohl prokaryotisch exprimierter und gereinigter, als auch eukaryotisch exprimierter Vpg- und Polymerase-Proteine erkannten die polyklonalen Seren in einer Western Blot Analyse zuverlässig Proteine der spezifischen Größe für Vpg (14-15 kDa) und der 3D-Polymerase (38 kDa). Die Antikörper bieten somit die Möglichkeit des spezifischen Nachweises dieser Proteine, sowohl nach prokaryotischer als auch eukaryotischer Expression, sowie innerhalb des viralen Kontextes.

5.2.3 Eukaryotische Expression rekombinanter Vpg- und 3D-Polymerase-Proteine

In der hier dargestellten Arbeit wurde das Vaccinia/T7-Hybrid-Expressionssystem genutzt, um die rekombinanten Vpg- und 3D-Polymerase-Proteine des Felinen Calicivirus zu exprimieren. Hierfür wurden das Vaccinia-Virus MVA/T7 und die Plasmidkonstrukte verwendet, die für das Vpg- bzw. für das 3D-Polymerasegen jeweils mit oder ohne Ankoppelung eines myc-Tags kodierten.

Zur Transfektion der Plasmide wurde die Lipofektion mit Fugene6 gewählt. Die angewandte Methode zeichnet sich durch eine hohe und gut reproduzierbare Expressionseffizienz aus. Vor allem in Kombination mit MVA/T7 wird bei der Nutzung von Liposomen-Komplexen eine Transfektionsfrequenz von nahezu 90% erreicht (Whitt *et al.*, 1990). Auch in der vorliegenden Arbeit konnten sehr gute Expressionsergebnisse erzielt werden (Transfektionsfrequenz von etwa 70%). Für die nachfolgenden Untersuchungen standen die gewünschten Proteine daher auch bei einer Transfektion relativ kleiner Zellpopulationen in ausreichender Menge zur Verfügung. Die hier verwendeten BSR-T7-Zellen führten zusätzlich zu einer Expressionssteigerung gegenüber Fcwf-oder CRFK-Zellen, da diese bereits eine stabil ins Genom integrierte T7-Polymerase besitzen. Außerdem zeigten die BSR-T7-Zellen nach einer MVA/T7-Infektion eine längere Lebensdauer als feline Zellen, so dass die rekombinanten Proteine in einem ausreichenden Zeitraum exprimiert werden konnten.

Das MVA/T7-Expressionssystem zeichnet sich zusätzlich durch eine fast universelle Anwendbarkeit aus, da die meisten kommerziell erhältlichen Vektoren bereits einen T7-Promotor (zur *in vitro* Transkription) besitzen. Vor allem aber wurde dieses System gewählt, da es dem ursprünglichen Replikationsmechanismus von RNA-Viren am nächsten kommt. Diese replizieren im Zytoplasma der Wirtszelle. Durch die vom Vaccinia-Virus bereitgestellten T7-Polymerase im Zytoplasma der Zelle umgeht man nicht nur die aufwendige Ausschleusung der RNA aus dem Zellkern, sondern auch jegliche Form posttranskriptionaler Modifikationen (RNA-Splicing) auf welche die RNA-Viren nicht vorbereitet sind. Auch die mRNA für das FCV-Kapsidprotein gelangt nach nukleärer Transkription nicht in intakter Form ins Zytoplasma (Geissler, 1998).
Die mit Hilfe des MVA/T7-Expressionssystems synthetisierten Vpg- und 3D-Polymerase-Proteine wurden von den polyklonalen Kaninchenseren sowohl im Western Blot als auch in der indirekten Immunfluoreszenz erkannt. Wie erwartet wiesen die mit einem myc-Tag fusionierten Proteine ein etwas erhöhtes relatives Molekulargewicht auf. Auch das Kapsidprotein und das ORF3 des Felinen Calicivirus konnten ohne Schwierigkeiten im optimierten MVA/T7-Expressionssystem exprimiert werden. Dabei konnte auch bei der Verwendung der nicht-felinen Zelllinie BSR-T7 die Bildung von leeren Viruskapsiden (VLPs) nach Transfektion des Kapsidgens (pCAPI) elektronenoptisch beobachtet werden (Etschmann, 2002).

5.3 Charakterisierung von Vpg und der 3D-Polymerase des Felinen Calicivirus

5.3.1 Untersuchung der Vpg-Expression im Infektionsverlauf

Das Vpg ist am 5‘-Ende der genomischen sowie der subgenomischen RNA gebunden. Welche Rolle das Protein an dieser Stelle spielt, ist jedoch noch nicht geklärt. Ein erster Hinweis auf mögliche Funktionen viraler Proteine ergibt sich oftmals durch Bestimmung des erstmaligen Auftretens der Proteine während des Replikationszyklus. Dabei haben früh exprimierte Proteine häufig regulative und/oder enzymatische Funktionen zu erfüllen und sind typischerweise Nichtstrukturproteine. Strukturproteine sowie Proteine, die eine funktionelle Rolle in einer späteren Phase des Replikationszyklus spielen, erscheinen dagegen erst mit deutlicher zeitlicher Verzögerung.

Zur Untersuchung der Expressionskinetik durch Western Blot-Analyse und durch eine indirekte Immunfluoreszenz des Vpg wurden Fcwf-Zellkulturen mit dem FCV-Isolat KS20 infiziert, wobei eine hohe moi von etwa 10 gewählt wurde. Das Virusmaterial wurde bereits nach 15 Minuten wieder entfernt, so dass nur adsorbierte Viren in die Zellen aufgenommen wurden und in synchronen Zyklen replizierten. Eine hohe moi gewährleistete, dass trotz der kurzen Inkubation die viralen Proteine in ausreichender Menge produziert wurden und somit detektierbar waren.

In einer Western Blot Analyse zeigte sich eine erste Reaktion der polyklonalen Anti-Vpg-Kaninchenseren mit den lysierten Zellen 4 Stunden nach der Infektion. Das detektierte Protein wies eine Größe von 43 bis 45 kDa auf und könnte dem von Sosnovtsev *et al.* (2002) postulierten Protein p43 entsprechen. Die Autoren konnten ein 30 kDa großes Protein (p30) zeigen, das von einer sehr variablen Sequenz des ORF1 kodiert wird. Aufgrund einer ambiphatischen Helixstruktur könnte es als Membrananker für Vpg fungieren mit dem zusammen es ein Vorläuferprotein bildet (p30 und Vpg (p13) = p43). Interessant ist, dass in der Studie von Sosnovtsev ein Anti-Vpg-Peptid-Serum das p43 und ein 13 bis 14 kDa großes Protein detektierte, wobei keine zeitlichen Angaben zum erstmaligen Auftreten der Proteine gemacht wurden. Das p30 wurde in dieser Studie nur von einem Antikörper gegen die für diese Region kodierende Sequenz detektiert. Im Gegensatz dazu konnten in der vorliegenden Arbeit insgesamt drei Proteine mit dem Anti-Vpg-Kaninchenserum nachgewiesen werden: das Vpg (14 bis 15 kDa), ein 43 bis 45 kDa und ein 25 kDa großes Protein. Dabei war das 43 bis 45 kDa Protein nach etwa 4 Stunden, das 25 kDa und das 15 kDa Protein nach 6 Stunden detektierbar. Zu diesem Zeitpunkt zeigten die Zellen einen deutlichen zytopathischen Effekt. Die Herkunft des 25 kDa Proteins ist noch unklar. Es erscheint möglich, dass dieses Protein ein Spaltprodukt des postulierten Vorläuferproteins p43 ist. Durch weitere Prozessierung entsteht schließlich freies Vpg. Mögliche Schnittstellen zur Abspaltung des 25 kDa Proteins vom p43-Vorläufer sind an den Positionen 727 (E)/728 (A), sowie 757 (E)/758 (A) zu finden. Durch Sequenzvergleiche fanden sich diese beiden Schnittstellen sowohl beim FCV-Isolat KS20 als auch bei Urbana, welches in der Studie von Sosnovtsev verwendet wurde. Warum das 25 kDa Protein nur in der vorliegenden Arbeit von einem Anti-Vpg-Antikörper detektiert werden konnte, bedarf weiterer Klärung. Möglicherweise wurde durch die Aufreinigung des prokaryotisch exprimierten Vpg-Proteins unter denaturierenden Bedingungen die Tertiär-Struktur des Proteins beeinträchtigt und so weitere Epitope freigelegt. Falls das Vpg durch ein Vorläuferprotein an zelluläre Membranen gebunden wird, ist, in Analogie zu Picornaviren,

auf jeden Fall eine Trennung des Vpg für eine produktive Virusinfektion nötig (Sosnovtsev *et al.* 2002; Takegami *et al.* 1983) (vgl. 2.2.5).
Durch die indirekte Immunfluoreszenzuntersuchung können erste Hinweise auf die Lokalisation eines Proteins in der Wirtszelle gewonnen werden. Das Anti-Vpg-Serum reagierte nach etwa 2 Stunden mit einem viralen Protein. Eine Fluoreszenz zeigte sich zunächst radial um den Kern und später im gesamten Zytoplasma, der Kern blieb dabei ausgespart. So konnte gezeigt werden, dass Vpg ausschließlich im Zytosol lokalisiert ist.

5.3.2 Untersuchung der 3D-Polymerase-Expression im Infektionsverlauf

Die 3D-Polymerase des Felinen Calicivirus ist für die Replikation der viralen RNA essentiell. Ihre Aufgabe besteht in der Synthese des Negativstrang-Intermediats und des Plusstrang Genoms als Erbinformation für die Nachkommenviren. Sie besitzt somit eine enzymatische Funktion und ihre Expression wird daher in einer frühen Phase des Replikationszyklus erwartet. Für die Versuchsanordnungen zur Untersuchung der Expressionskinetik der 3D-Polymerase durch Western Blot-Analyse und in der indirekten Immunfluoreszenz gelten die unter Punkt 5.3.1 genannten Bedingungen.
Das errechnete Molekulargewicht der Polypeptidkette der Polymerase sollte bei etwa 38 kDa liegen. Tatsächlich detektierte das Anti-3D-Polymerase-Kaninchenserum in FCV-infizierten Zellen 4 Stunden *p.i.* ein Protein der molekularen Masse von 78 kDa in der Western Blot-Analyse. Immunfluoreszenzuntersuchungen zeigten schon nach 2 Stunden *p.i.* eine eindeutige Reaktion des Serums mit einem viralen Protein, das zytoplasmatisch lokalisiert war. Dieses Expressionsmuster steht somit im Einklang mit dem postulierten Replikationsschema des FCV. Ferner ist auch in der Literatur ein 78 kDa Protein nachgewiesen worden (Sosnovtseva *et al.*, 1999; Sosnovtsev *et al.*, 2002), wobei keine Angaben zur zeitlichen Expression gemacht wurden. In diesen Studien wurde ein polyklonales Antiserum verwendet, das einen größeren antigenen Bereich einschließlich der 3D-Polymerase und der 3C-Protease abdeckte (Anti-Pro-Pol-Serum). Bei dem 78 kDa Protein handelt es sich um das Protease-Polymerase-Vorläuferprotein (Pro-Pol-Vorläufer), welches als primäre, aktive Form der Polymerase vermutet wird (Wei *et al.*, 2001) (vgl. hierzu 2.2.4). Nur das Pro-Pol-Vorläuferprotein akkumulierte zu einem signifikanten Level, wobei für die Aktivität der Polymerase keine proteolytische Abspaltung von der Protease notwendig war. Auch das in der vorliegenden Arbeit verwendete Antiserum gegen die 3D-Polymerase alleine konnte nur das 78 kDa Vorläuferprotein und keine freie Polymerase nachweisen.

.

Die Verteilung der Polymerase ähnelt sehr der Lokalisation des Vpg. Auch die Expressionskinetik in der Western Blot-Analyse war vergleichbar. Funktionelle Zusammenhänge zwischen den beiden Proteinen können so vermutet werden.

5.3.3 Serumneutralisationstest mit den Anti-Vpg- und Anti-3D-Pol-Kaninchenseren

Durch die Bindung von Antikörpern an neutralisierende Epitope der Virionen kann eine Infektion verhindert werden. So können Antiseren gegen das Kapsidprotein des FCV eine Virusneutralisation bewirken (Tohya *et al.*, 1991).
Die Calicivirusvirionen enthalten zumindest drei Proteine: das Kapsid, das Vpg und das ORF3-Protein (Sosnovtsev und Green, 2000). Dabei ist noch nicht geklärt, wo sich die beiden letztgenannten Proteine im Virion befinden. Proteine, die an der Oberfläche der Virionen positioniert sind, scheinen eher eine Virusneutralisation auszulösen. Nach Auswertung der Ergebnisse zeigte sich kein neutralisierender Effekt der Anti-Vpg-Kaninchenseren auf das FCV. Rückschlüsse auf die Lokalisation des Vpg können dennoch nicht gezogen werden, da auch nicht-neutralisationsrelevante Epitope oberflächlich liegen können.
Das Ergebnis eines Neutralisationstests mit den Anti-Polymerase-Seren fiel ebenfalls negativ aus. In der Literatur finden sich allerdings keinerlei Hinweise auf ein Vorhandensein der 3D-Polymerase in den viralen Partikeln, so dass dieses Ergebnis zu erwarten war.

5.3.4 Untersuchung einer Interaktion zwischen FCV-Proteinen

Das virale Protein Vpg ist kovalent an das 5‘-Ende der genomischen sowie der subgenomischen RNA des Felinen Calicivirus gebunden. Welche Funktion das Vpg an dieser Stelle zu erfüllen hat ist noch nicht geklärt. In der vorliegenden Arbeit sollten deshalb zwei Hypothesen näher untersucht werden. Zum einen erscheint es möglich, dass das Vpg an der Enkapsidierung des viralen Genoms beteiligt sein könnte, da nur die an Vpg gebundene RNA in viralen Partikeln enthalten ist. Dazu würde das Vpg in Wechselwirkung mit dem Kapsidprotein treten und so das virale Genom in den Virionen verankern. In einer zweiten Theorie wird die Möglichkeit diskutiert, dass das Vpg bei der Transkription viraler RNA eine Rolle spielen könnte. Dabei stellt das Vpg möglicherweise eine Initiationsstelle für die RNA Synthese dar und fungiert eventuell als Primer für die RNA-abhängige RNA-Polymerase. In diesem Fall könnte eine Interaktion zwischen dem Vpg und der 3D-Polymerase des Felinen Calicivirus einen ersten Hinweis liefern (vgl. zu den verschiedenen Theorien Punkt 2.2.5).

.

Interaktionen zwischen Proteinen können mit Hilfe biochemischer (Affinitätschromatographie, Immunopräzipitation) und chemischer Methoden (Crosslinking) oder analytischer Ultrazentrifugation identifiziert und quantifiziert werden (Lottspeich und Zorbas, 1998). Eine weitere Möglichkeit bietet das Two-Hybrid-System. Alle genannten Verfahren beruhen auf einer Untersuchung von Protein-Interaktionen *in vitro*. Beim sogenannten Crosslinking werden Proteine über Linker kovalent zusammengehalten, so dass eine Dissoziation der Komplexe verhindert wird. Diese Methode wird vor allem zur Analyse von Molekülen angewandt, die sich in unmittelbarer Nähe eines Proteins befinden und daher vermutlich funktionelle Partner sind. Für ein erstes Screening einer Interaktion löslicher Proteine ist dieses Verfahren ungeeignet. Die anlytische Ultrazentrifugation ist auch in der Lage kurzlebige Wechselwirkungen zwischen Reagenten zu identifizieren. Für diese Methode ist allerdings ein enormer technischer und apparativer Aufwand nötig. Eine weit verbreitete und relativ einfache Methode zur direkten Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen ist das Two-Hybrid-System (oder auch „interaction trap“). Das Prinzip des Systems beruht auf einem Transkriptionsfaktor von Hefezellen, der aus zwei funktionell trennbaren Domänen besteht. Je einer der potentiellen Reaktionspartner wird mit einer dieser Domänen fusioniert und in den Hefezellen exprimiert. Im Fall einer Interaktion der beiden Proteine bildet sich so wieder ein aktiver Komplex, der eine Transkription der Proteine ermöglicht (Watson *et al.*, 1993). Die Expression erfolgt dabei verfahrenstechnisch bedingt über den Zellkern, so dass es zu posttranskriptionalen Modifikationen (RNA-Splicing) kommt. Diese sind zwar für Eukaryoten typisch, aber RNA-Viren sind auf diese Phänomene nicht vorbereitet. Auch das FCV-Kapsidproteingen weist einige Konsensus-Sequenzen auf, die einen Splicing-Vorgang ermöglichen, so dass damit zu rechnen ist, dass das ORF2 nach nukleärer Transkription nicht als intakte mRNA ins Zytoplasma gelangt (Geissler, 1998).

Für die Untersuchung von möglichen Wechselwirkungen zwischen den FCV-Proteinen wurde deshalb eine andere Methode, die Co-Immunopräzipitation, angewendet. Dieses Verfahren beruht auf der Immunpräzipitation eines Köderproteins in einem Zweiphasensystem. Das Köderprotein wird dabei an eine feste Phase gebunden. Eine Interaktion mit einem Zielprotein kann anschließend durch Analyse der beiden Phasen relativ einfach identifiziert werden. Dieses Nachweisverfahren besitzt eine hohe Spezifität bei geringerer Empfindlichkeit. Dabei können für eine Protein-Protein-Co-Immunopräzipitation Proteine aus beliebigen Expressionssystemen eingesetzt werden.

Die Methode wurde zum Nachweis einer möglichen Wechselwirkung zwischen Vpg und dem Kapsidprotein, sowie zwischen Vpg und der 3D-Polymerase verwendet. Nach Auswertung

der Ergebnisse ließen sich keine Interaktionen zwischen den genannten Proteinpaaren nachweisen.

Zudem fiel die Untersuchung auf eine Wechselwirkung zwischen der 3D-Polymerase und dem Kapsidprotein, der 3D-Polymerase und dem ORF3-Protein, sowie zwischen dem Vpg und dem ORF3-Protein ebenfalls negativ aus. Diese Versuche wurden zur Vervollständigung des Systems durchgeführt. Ausserdem erschien die Untersuchung einer potentiellen Interaktion zwischen Vpg und dem ORF3-Protein sinnvoll, da auch das ORF3 hinsichtlich einer Enkapsidierung des viralen Genoms diskutiert wird (Neill *et al.*, 1991). So hätte im Fall einer Interaktion zwischen ORF3 und dem Kapsidprotein, eine Bindung zwischen dem Vpg und dem ORF3 eine Verankerung des Genomes im Kapsid bewirken können. In diesem Zusammenhang wurde in einer früheren Arbeit eine Wechselwirkung zwischen ORF3 und dem Kapsidprotein und zwischen ORF3 und FCV-Genomabschnitten mit Hilfe der Co-Immunipräzipitation untersucht (Etschmann, 2002). Die Ergebnisse dieser Studien waren ebenfalls negativ.

Bei der Interpretation der Ergebnisse ist zu beachten, dass die Dissoziationsraten der Interaktionspartner bei biochemischen Detektionsmethoden nicht zu groß sein dürfen. Die durch Wechselwirkung verbundenen Proteine müssen zeitaufwendige und stringente Waschprotokolle überstehen, welche Hintergrundsignale zum großen Teil senken sollen. Aufgrund dieser Tatsache kann geschlossen werden, dass mit der angewandten Methode keine Interaktion zwischen den einzelnen Reaktionspartnern nachgewiesen werden kann. Zudem fanden diese Reaktionen außerhalb des Zellverbandes statt, so dass mögliche andere Faktoren nicht berücksichtigt werden konnten.

5.4 Abschließende Bewertung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit diente der weiteren Charakterisierung des Vpg und der 3D-Polymerase des Felinen Calicivirus.

Das 3CD-Vorläuferprotein wurde für das FCV-Isolat KS20 als einzige detektierbare Form der 3D-Polymerase, trotz Verwendung eines spezifisch gegen die Polymerase gerichteten Antikörpers, identifiziert. Es scheint daher wahrscheinlich, dass diese Form auch bei FCV-KS20 die primäre aktive Polymerase darstellt. Die 3D-Polymerase ist ein früh exprimiertes Protein, das im Zytoplasma liegt und keine neutralisierenden Antikörper induziert.

Das Vpg ist im Zytoplasma lokalisiert und vermittelt keine Virusneutralisation. Es liegt in freier Form erst in einer späteren Phase des Replikationszylus des FCV vor. Dabei konnten

für das FCV-Isolat KS20 zwei mögliche Vorläuferproteine (43 bis 45 und 25 kDa) detektiert werden. Andere Autoren postulieren, dass das Vorläuferprotein der Verankerung des Vpgs in intrazellulären Membranen dient. Zudem liegen gerade in diesem Bereich Unterschiede zu einem anderen Isolat vor. Aus diesem Grund sollten die Vorläuferproteine in weiteren Studien näher charakterisiert werden. Interessant sind in diesem Fall auch Co-Lokalisationsstudien, da die untersuchten Proteine Vpg und 3D-Polymerase ähnlich verteilt waren und die gleiche Expressionskinetik aufwiesen.
Zwei Theorien zu einer möglichen Funktion des Vpg wurden näher untersucht. Dabei ergaben sich keine Hinweise auf eine Rolle des Vpg bei der Enkapsidierung viraler RNA oder auf ihre mögliche Funktion als Initiationsstelle der RNA-Synthese. Potentielle Interaktionen des Vpg mit anderen Komponenten entstehender FCV-Virionen sollten daher mit empfindlicheren Verfahren geprüft werden.

Ein großer Nachteil bei der molekularen Charakterisierung einiger Vertreter der Familie *Caliciviridae*, einschließlich der humanen Caliciviren und des RHDV, stellt das Problem dar, dass bis jetzt noch kein Zellkultursystem zur Virusreplikation etabliert ist. Das Feline Calicivirus wächst sehr effizient in felinen Zellkulturen, so dass viele Erkenntnisse über die Replikation der Caliciviren durch Studien an diesem Vertreter der Virusfamilie gewonnen werden konnten. Vor allem aber stellt das FCV für Feliden selbst ein sehr virulentes Agens dar. Weitere Studien, die zu einem besseren Verständnis der molekularen Grundlagen der Caliciviren beitragen, sind deswegen unerlässlich und könnten neue Entwicklungen im Bereich der Molekularbiologie dieser wichtigen Pathogene aufzeigen.

6 Zusammenfassung

Caliciviren sind kleine, unbehüllte Viren mit einem RNA-Genom positiver Polarität. Die Vertreter der Familie *Caliciviridae* sind Erreger wichtiger, zum Teil sehr unterschiedlicher Erkrankungen bei Mensch und Tier. Die humanpathogenen Viren werden mit epidemischen Gastroenteritiden assoziiert (Noro-und Sapoviren), die tierpathogenen Viren verursachen eine schwere generalisierte Erkrankung bei Lagomorpha (RHDV, EBHSV) oder vesikuläre Läsionen bei Schweinen (SMSV). Das Feline Calicivirus (FCV) gilt als einer der Haupterreger des Katzenschnupfenkomplexes. Das FCV ist für Replikationsstudien an Caliciviren besonders gut geeignet, da es sich effizient in Zellkultursystemen vermehrt.

Der Replikationszyklus, insbesondere die Funktion einiger Nichtstrukturproteine bei der Replikation der Caliciviren, ist nur zum Teil aufgeklärt. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit zwei Nichtstrukturproteine des FCV, das Vpg und die RNA-abhängige RNA-Polymerase (3D-Polymerase), näher charakterisiert.

Die 3D-Polymerase ist für die Replikation der viralen RNA zuständig und sorgt somit für die Weitergabe korrekter Erbinformationen an die Nachkommenviren. Das Vpg ist ein viruskodiertes Protein, welches kovalent an den 5‘-Terminus der genomischen und subgenomischen RNA gebunden ist. Es werden verschiedene Theorien über die möglichen Funktionen, die das Vpg an dieser Stelle zu erfüllen hat, diskutiert. Zum einen beschäftigt sich diese Arbeit mit der Hypothese, dass das Vpg bei der Transkription der viralen RNA eine Rolle spielt und möglicherweise als Primer für die 3D-Polymerase dient. Zum anderen wurde untersucht, ob das Vpg an der Enkapsidierung der genomischen und subgenomischen RNA in die viralen Partikel beteiligt ist.

Dazu wurden das Vpg und die 3D-Polymerase zunächst prokaryotisch exprimiert und aufgereinigt und anschließend die gereinigten Proteine zur Generierung polyklonaler Antikörper in Kaninchen verwendet. Die Expressionskinetik der beiden Proteine wurde durch Analyse FCV-infizierter Zellen mit Hilfe immunologischer Nachweismethoden (Western Blot und indirekte Immunfluoreszenz) untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die 3D-Polymerase in einer frühen Phase des Replikationszyklus exprimiert wird. Sie tritt auch beim FCV-Isolat KS20 nur in Verbindung mit der 3C-Protease als sogenanntes 3CD-Vorläuferprotein auf, freie Polymerase ist nicht nachweisbar. Im Gegensatz zur 3D-Polymerase liegt das Vpg-Protein in einer späteren Phase des Replikationszyklus des FCV in freier Form vor. Es wurden für das FCV-Isolat KS20 zwei mögliche Vorläuferproteine von etwa 43 bis45 kDa und von 25 kDa detektiert, deren Funktion unklar ist.

Die 3D-Polymerase und das Vpg wurden nur im Zytopasma der Wirtszelle lokalisiert. Beide induzieren keine neutralisierenden Antikörper.

Nach eukaryotischer Expression rekombinanter Vpg- und 3D-Polymerase-Proteine, sowie des Kapsidproteins und des ORF3 des FCV, wurde zur Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Proteinen eine Co-Immunopräzipitation durchgeführt. Bei keinem der untersuchten Proteinpaare konnte eine Interaktion festgestellt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit war es möglich polyklonale Antikörper gegen das Vpg und die 3D-Polymerase des FCV zu generieren und sowohl die Lokalisation als auch die Expressionskinetik der beiden Proteine weiter zu charakterisieren. Die Hypothesen, dass durch Vpg-Priming eine Interaktion zwischen dem Vpg und der 3D-Polymerase, oder dass zum Zweck einer Enkapsidierung eine Wechselwirkung zwischen dem Vpg und dem Kapsidprotein besteht, konnten in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

.

Functional Characterisation of the Vpg-Protein and the 3D-Polymerase, two Nonstructural Proteins of Feline Calicivirus

Summary

Caliciviruses are small, non-enveloped viruses that possess a positive-stranded RNA genome. The members of the family *Caliciviridae* are associated with several important diseases in humans and animals. The human pathogens cause epidemic gastroenteritis (Noro- and Sapoviruses), whereas caliciviruses that infect animals cause a severe generalized disease in lagomorphs (RHDV, EBHSV) or vesicular lesions in swine (VESV). The feline calicivirus (FCV) is a main causative agent of cat flu. FCV is a suitable means for the study of the replication cycle of caliciviruses, as it grows in cultured feline cells efficiently.

There are still several aspects of the replication cycle, particularly the function of some nonstructural proteins during replication, that remain unclear. Therefore, in this study, it was the aim to further characterize two nonstructural proteins of FCV, the Vpg and the RNA-dependent RNA-Polymerase (3D-Polymerase).

The 3D-Polymerase is responsible for the replication of the virus genome and, thus, for passing the correct genetic information on to the progeny virus. Vpg is a virally encoded protein that is covalently linked to the 5‘-terminus of genomic and subgenomic RNA. There are different theories concerning the possible functions Vpg has to fulfill in this position. On the one hand, it was the goal of this studie to analyze wether Vpg plays a role in transcription of viral RNA and may act as a primer for 3D-Polymerase. On the other hand, the hypothesis that Vpg has the function of facilitating the encapsidation of the viral genomic and subgenomic RNA was to be investigated.

For this purpose, Vpg and 3D-Polymerase were expressed procaryotically and purified. Subsequently, the purified proteins were used to generate polyclonal antibodies. Using these tools, the expression kinetics of both proteins were analyzed using immunological assays (western blot and immunfluorescence). In these investigations, it was found that 3D-Polymerase is expressed cytoplasmatically in an early stage of replication. Furthermore, even in the FCV-isolate KS20, 3D-Polymerase can be detected only in combination with 3C-Protease in form of the so-called 3CD-Precursorprotein, whereas free Polymerase can not be detected. In contrast to 3D-Polymerase, the free form of Vpg-protein is expressed in a later phase of the viral replication cycle. Two possible precursorproteins of approximately 43 to 45 kDa and 25 kDa can be detected using FCV-isolate KS20, whose functions remain unclear.

.

3D-Polymerase and Vpg are both expressed in the cytosol and neither of these proteins induce neutralizing antibodies.

A co-immunoprecipitation assay was performed to identify reciprocal action between different proteins encoded by the FCV-genome. After eucaryotic expression of recombinant Vpg- and 3D-Polymerase-proteins, as well as of the capsid protein and of ORF3, these were used in co-immunoprecipitation assays. No interaction could be detected in any of the protein pairs examined.

Within this study it was possible to generate polyclonal antibodies against Vpg and 3D-Polymerase of FCV and to further characterize the location and the expression kinetics of both proteins. Nevertheless these data were neither able to confirm the hypothesis that there is an interaction between Vpg and 3D-Polymerase because of Vpg-priming, nor that Vpg interacts with the capsid protein to enable encapsidation of the genome into the viral particles.

.

7 Literaturverzeichnis

Ambros V., Baltimore D. 1978.

Protein is linked to the 5‘end of poliovirus RNA by a phosphodiester linkage to tyrosine.

Journal of Biological Chemistry 253: 5263-5266.

Boga J.A., Marin M.S., Casais R., Prieto M., Parra F. 1992.

In vitro translation of a subgenomic mRNA from purified virions of the Spanish isolate AST/89 of rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV).

Virus Research 26: 33-40.

Burroughs J.N., Brown F. 1978.

Presence of a covalently linked protein on calicivirus RNA.

Journal of general Virology 41: 443-446.

Carter M.J. 1989.

Feline calicivirus protein synthesis investigated by western blotting.

Archieves of Virology 114: 143-152.

Carter M.J., Milton I.D., Meanger J., Bennett M., Gaskell R.M., Turner P.C. 1992a.

The complete nucleotide sequence of a feline calicivirus.

Virology 190: 443-448.

Carter M.J., Milton I.D., Meanger J., Bennett M., Gaskell R.M., Turner P.C. 1992b.

Identification and sequence etermination of the capsid protein gene of feline calicivirus.

Archieves of Virology 122: 23-235.

Clarke I.N., Lambden P.R. 1997.

The molecular biology of caliciviruses.

Journal of General Virology 78: 291-301.

Clarke I.N., Lambden P.R. 2000.

Organization and expression of calicivirus genes.

The Journal of Infectious Diseases 181(Suppl 2): 309-316.

Crandell R.A., Fabriciant C.G., Nelson-Reese W.A. 1973.

Development, characterization and viral susceptibility of a feline (felis catus) renal cell line (CRFK).

In Vitro 9: 176-185.

.

Dawson S., Carter S.D., Bennett M., Meanger J., Turner P.C., Carter M.J., Milton I., Gaskell R.M. 1994.
Acute arthritis of cats associated with feline calicivirus infection.
Research in Veterinary Science 56: 133-143.

Dingle K.E., Lambden P.R., Caul E.O., Clarke I.N. 1995.
Human enteric *Caliciviridae*: The complete genome sequence and expression of virus-like particles from a genetic group II small round structured viruses.
Journal of General Virology 76: 2349-2355.

Dunham D.M., Jiang X., Berke T., Smith A.W., Matson D.O. 1998.
Genomic mapping of a calicivirus Vpg.
Archives of Virology 143: 2421-2430.

Etschmann B. 2002.
Funktionelle Charakterisierung des ORF3-Proteins des Felinen Calicivirus.
Dissertation, Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Evermann J.F., McKeirnan A.J., Smith A.W., Skilling D.E., Ott R.L. 1985.
Isolation and identification of caliciviruses from dogs with enteric infections.
American Journal of Veterinary Research 46: 218-220.

Fastier L.B. 1957.
A new feline virus isolated in tissue culture.
American Journal of Veterinary Research 18: 382.

Felgner P.L., Gadek T.R., Holm M., Roman R., Chan H.W., Wenz M., Northrop J.P., Ringold G.M., Danielson M. 1987.
Lipofectin: A highly efficient, lipid-mediated DNA/transfection procedure.
Procceedings of the National Academy of Sciences USA 84: 7413-7417.

Flanegan J.B., Pettersson R.F., Ambros V., Hewlett M.J., Baltimore D. 1977.
Covalent linkage of a protein to a defined nucleotide sequence at the 5‘terminus of virion and replicative intermediate RNAs of poliovirus.
Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74: 961-965.

Fujimura T., Wickner R.B. 1988.
Gene overlap results in a viral protein having an RNA binding domain and a major coat protein domain.
Cell 55: 663-671.

.

Geissler K. 1998.

Molekulare Charakterisierung des Felinen Calicivirus FCV-KS20 und Untersuchungen zum Kapsidassembly.

Dissertation, Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität, München.

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., Thiel H.J. 2000.

Taxonomy of the caliciviruses.

The Journal of Infectious Diseases 181 (Suppl2): 322-330.

Green K.Y., Mory A., Fogg M.H., Weisberg A., Belliot G., Wagner M., Mitra T., Ehrenfeld E., Cameron C.E., Sosnovtsev S.V. 2002.

Isolation of enzymatically active replication complexes from feline calicivirus-infected cells.

Journal of Virology 76(17): 8582-8595.

Hardy M.E., White L.J., Ball J.M., Estes M.K. 1995.

Specific proteolytic cleavage of recombinant Norwalk-virus capsid protein.

Journal of Virology 69: 1693-1698.

Harris K.S., Reddigari S.R., Nicklin M.J.H., Hammerle T., Wimmer E. 1992.

Purification and characterisation of poliovirus polypeptide 3CD, a proteinase and a precursor for RNA polymerase.

Journal of Virology 66: 7481-7489.

Herbert T.P., Brierley I., Brown T.D.K. 1997.

Identification of a protein linked to the genomic and subgenomic mRNAs of feline calicivirus and its role in translation.

Journal of General Virology 78: 1033-1040.

Herbert T.P., Brierly I., Brown T.D.K. 1996.

Detection of the ORF3 polypeptide of feline calicivirus in infected cells and the evidence for its expression from a single, functionally bicistronic, subgenomic mRNA.

Journal of General Virology 77: 123-127.

Holden C. 1995.

Rabbit biocontrol project in disarray.

Science 270: 1123.

Jiang X., Wang M., Graham D.Y., Estes M.K. 1992.

Expression, self-assembly and antigeniticity of the Norwalk virus capsid protein.

Journal of Virology 66: 6527-6532.

.

Komolafe O.O., Jarrett O., Neil J.C. 1980.

Feline calicivirus induced polypeptides.

Microbios 27: 185-192.

Koonin E.V. 1991.

The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses.

Journal of General Virology 72: 2197-2206.

Kozak M. 1987.

An analysis of 5‘-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs.

Nucleic Acids Research 15(20): 8125-8148.

Kreutz L.C., Seal B.S., Mengeling W.L. 1994.

Early interaction of feline calicivirus with cells in culture.

Archieves of Virology 136: 19-34.

Kuhn R.J., Wimmer E. 1987.

The replication of picornaviruses.

In: Rowlands D.J., Mayo M.A., Mahy B.W.J.(ed.). The molecular biology of the positive strand RNA viruses. 17-51.

Aademic Press, London, United Kingdom.

Laemmli U.K. 1970.

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature 227: 680-685.

Liu S.J., Xue H.P., Pu B.Q., Qian N.H. 1984.

A new viral disease in rabbits.

Animal Husbandry and Veterinary Medicine 16: 253-255.

Lottspeich F., Zorbas H. 1998.

Bioanalytik.

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

Madeley C.R., Cosgrove B.P. 1976.

Calicivirus in man.

Lancet i: 199-200.

Mayr A., Bachmann P.A., Bibrack B.

Virologische Arbeitsmethoden. (Band I und II 1997, Band IV 1982).

Urban Fischer Verlag, München.

.

Meyers G., Wirblich C., Thiel H.J. 1991.

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. 1991.

Rabbit hemorrhagic disease virus-molecular cloning and nucleotide sequencing of a calicivirus genome.

Virology 184: 664-676.

Mochizuki M. 1991.

Different stabilities to bile among feline calicivirus strains of respiratory and enteric origin.

Veterinary Microbiology 31: 297-302.

Moss B., Elroy-Stein O., Mizukami T., Alexander W., Fuerst T. 1990.

New mammalian expression vectors.

Nature 348: 91-92.

Neill J.D. 1990.

Nucleotide sequence of a region of the feline calicivirus genome which encodes picornavirus-like RNA-dependent RNA polymerase, cysteine protease and 2C polypeptides.

Virus Research 17: 145-160.

Neill J.D. 1992.

Nucleotide sequence of the capsid protein gene of two serotypes of San Miguel sea lion-virus: Identification of conserved and non-conserved amino acid sequences among calicivirus capsid proteins.

Virus Research 24: 211-222.

Neill J.D. 2002.

The subgenomic RNA of feline calicivirus is packaged into viral particles during infection.

Virus Research 87: 89-93.

Neill J.D., Mengeling W.L. 1988.

Further characterization of virus-specific RNAs in feline calicivirus infected cells.

Virus Research 11: 59-72.

.

Neill J.D., Reardon I.M., Heinrikson R.l. 1991.

Nucleotide sequence and expression of the capsid protein gene of feline calicivirus.

Journal of Virology 65: 5440-5447.

Nomoto A., Kitamura N., Golini F., Wimmer E. 1977.

The 5‘-terminal structures of poliovirion RNA and poliovirus mRNA differ only in the genome-linked protein Vpg.

Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74: 5345-5349.

Palmenberg A.C. 1990.

Proteolytic processing of Picornaviral Polyprotein.

Annual Review of Microbiology 44: 603-623.

Pettersson R.F., Ambros V., Baltimore D. 1978.

Identification of a protein linked to nascent poliovirus RNA and to the polyuridylic acid of negative-strand RNA.

Journal of Virology 27: 357-365.

Plotch S.J., Palant O. 1995.

Poilovirus protein 3 AB forms a complex with and stimulates the activity of the viral RNA polymerase, 3Dpol.

Journal of Virology 69: 7169-7179.

Porath J., Carlsson J., Olsson I., Belfrage G. 1975.

Metal chelate affinity chromatographie, a new approach to protein fractionation.

Nature 258: 598-599.

Prasad B.V.V., Matson D.O., Smith A.W. 1994.

Three-dimensional structure of calicivirus.

Journal of Molecular Biology 240: 256-264.

Prato C.M., Akers T.G., Smith A.W. 1974.

Serological evidence of calicivirus transmission between marine and terrestrial mammals.

Nature 249: 255-256.

Robinson A.J., Westbury H.A. 1997.

The Australian and New Zealand rabbit calicivirus disease programme.

Proceedings of the 1st International Symposium of Caliciviruses ESVV (1997) 144-155, edited by Chasey D., Gaskell R.M. and Clarke I.N.

.

Schaffer F.L., Ehresmann D.W., Fretz M.K., Soergel M.E. 1980.
A protein, Vpg, covalently linked to 36S calicivirus RNA.
Journal of general Virology 47: 215-220.

Schneider K. 1999.
Antigene Charakterisierung des Felinen Calicivirus (FCV) und Expression chimärer Kapsidproteine.
Dissertation, Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Saiki R.K., Gelfand G.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Ehrlich H.A. 1988.
Primer-directed enzymatic amplification of DANN with a thermostable DNA polymerase.
Science 239: 487-491.

Sibilia M., Boniotti M.B., Angoscini P., Capucci L., Rossi C. 1995.
Two independent pathways of expression lead to self-assembly of the rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein.
Journal of Virology 69: 5812-5815.

Smith A.W., Akers T.G., Madin S.H., Vedros N.A. 1973.
San Miguel sea lion virus isolation, preliminary characterization and relationship to vesicular exanthema of swine virus.
Nature 244: 108-110.

Smith A.W., Skilling D.E., Cherry N., Mead J.H., Matson D.O. 1998.
Calicivirus emergence from ocean reservoirs: zoonotic and interspecies movements.
Emerging Infectious Diseases 4(1).

Sosnovtsev S., 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(2): 383-390.

Sosnovtsev S.V., Garfield M., Green K.Y. 2002.
Processing map and essential cleavage site of the nonstructural polyprotein encoded by ORF1 of the feline calicivirus genome.
Journal of Virology 76(14): 7060-7072.

.

Sosnovtsev S.V., Green K.Y. 2000.
Identification and Genomic Mapping of the ORF3 and Vpg Proteins in Feline Calicivirus Virions.
Virology 277: 193-203.

Sosnovtsev S.V., Sosnovtseva S.A., Green K.Y. 1998.
Cleavage of the feline calicivirus capsid precursor is mediated by a virus-encoded proteinase.
Journal of Virology 72: 3051-3059.

Sosnovtseva S.A., Sosnovtsev S.V., 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.
Journal of Virology 73: 6626-6633.

Stanley J., van Kammen A. 1979.
Nucleotide sequence adjacent to the proteins covalently linked to the cowpea mosaic virus genome.
European Journal of Biochemistry 101: 45-49.

Takegami T., Semler B.L., Anderson C.W., Wimmer E. 1983.
Membrane fractions active in poliovirus RNA replication contain Vpg precursor polypeptides.
Virology 128: 33-47.

Thumfart J.O., Meyers G. 2002.
Feline Calicivirus: Recovery of wild-type and recombinant viruses after transfection of cRNA or cDNA constructs.
Journal of Virology 76 (12): 6398-6407.

Tohya Y., Masuoka K., Takahashi E., Mikami T. 1991.
Neutralizing epitopes of feline calicivirus.
Archieves of Virology 117: 173-181.

Towbin H., Staehelin T., Gordon J. 1979.
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: Procedures and some applications.
Proceedings of the National Academy of Sciences USA 76: 4350-4354.

.

Traum J. 1934.

Foot-and-mouth disease: specific treatment, eradication and differential diagnosis.

In: Proceedings of the 12th International Veterinary Congress. New York 2: 87.

Ueda K., Park J.H., Ochiai K., Itakura C. 1992.

Disseminated intravascular coagulation (DIC) in rabbit hemorrhagic disease.

The Japanese Journal of Veterinary Research 40: 133-141.

Ward W.W., Cody C.W., Hart R.C., Cormier M.J. 1980.

Spectrophotometric identity of the energy transfer chromophores in Renilla and Aequorea green-fluorescent proteins.

Photochemistry and Photobiology 31: 611-615.

Watson J.D., Gilman M., Witkowski J., Zoller M. 1993.

Rekombinierte DNA.

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

Wei L., Huhn J.S., Mory A., Pathak H.B., Sosnovtsev S.V., Green K.Y., Cameron C.E. 2001.

Proteinase-polymerase precursor as the active form of feline calicivirus RNA-dependent RNA polymerase.

Journal of Virology 75(3): 1211-1219.

Whitt M.A., Buonocore L., Rose J.K., Ciccorone V., Gebeyehu G. 1990.

Transfect ACE reagent promotes transient transfection frequencies greater than 90%.

Focus 13: 8-12.

Wildy P. 1971.

Classification and nomenclature of Viruses.

In: Monographs in Virology. Karger,Basel.

Wimmer E. 1982.

Genome-linked proteins of viruses.

Cell 28: 199-201.

Wirblich C., Meyers G., Ohlinger V.F., Capucci L., Eskens U., Haas B., Thiel H. 1994.

European brown hare syndrome virus: relationship to rabbit hemorrhagic disease virus and other calicivirus.

Journal of Virology 68: 5164-5173.

.

Wirblich C., Sibilia M., Boniotti M.B., Rossi C., Thiel H.-J., Meyers G. 1995.
3C-like protease of Rabbit hemorrhagic disease virus: Identification of cleavage sites in the ORF1 polyprotein and analysis of cleavage specificity.
Journal of Virology 69(11): 7159-7168.

Zhou L., Yu Q., Lou M. 1994.
Characterization of two density populations of feline calicivirus particles.
Virology 205: 530-533.

.

8 Anhang

8.1 Verwendete Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µ	mikro
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
c	zenti
ca.	zirka
cDNA	komplementäre DNA
CMV	Cytomegalievirus
CO_2	Kohlenstoffdioxid
cpe	zytopathischer Effekt
CRFK	Crandell-Reese Feline Kidney
dATP	Desoxyadenosin-5‘-triphosphat
dCTP	Desoxycytosin-5‘-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanin-5‘-triphosphat
DMEM	Dulbecco‘s Minimal Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinacid
dTTP	Desoxythymidin-5‘-triphosphat
E.coli	*Escherichia coli*
EBHSV	European Brown Hare Syndrome Virus
et al.	und andere (lat. *et altera*)
Fa.	Firma
FCV	Felines Calicivirus
FCV-KS20	Felines Calicivirus Isolat KS20

.

FHV	Felines Herpesvirus
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
GFP	Green Fluorescent Protein
GOI	Gene of Interest
His-Tag	Hexahistidinrest
HRP	Horseraddish Peroxidase
HuCV	Humanes Calicivirus
ICTV	International Committee on Taxanomy of Viruses
IE	Internationale Einheiten
Ig	Immunglobulin
i.m.	intra muskulär
IP	Isoelektrischer Punkt
IPTG	Isopropyl-ß-D-Thiogalaktosid
IHRES	Internal Ribosomal Entry Site
k	Kilo
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KID	Kulturinfektiöse Dosis
l	Liter
λ	Lambda (Wellenlänge)
LB	Luria Bertani
m	Meter
m	milli
M	Molar
M.	*Musculus*
mA	Milliampere
MCS	Multiple Cloning Site
MEM	Minimal Essential Medium
min	Minute
MOI	Multiplicity of Infection
mRNA	messanger RNA

.

MVA/T7	Modifiziertes Virus Ankara mit rekombinanter T7-Polymerase
n	nano
NCR	Non-Coding Region
nt.	Nukleotid
NV	Norwalk-Virus
OD	Optische Dichte
ORF	Open Reading Frame
p.i.	*post infectionem*
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	potentia Hydrogenium
POD	Peroxidase
POI	Protein of Interest
Pol	Polymerase
Poly A	Adenylatpolymer
Pro	Protease
RdRP	RNA-dependent RNA-Polymerase
RHDV	Rabbit Hemorrhagic Disease Virus
RNAse	Ribonuklease
RNS	Ribonucleinacid
rpm	rounds per minute
RT	Reverse Transkription
SDS-PAGE	Sodiumdodecylephosphate-Polyacrylamidgelelectrophoresis
SHV	Southhampton Virus
SMSV	San Miguel Sea Lion Virus
SRSV	Small Round Structured Viruses
STV	Saline Trypsin Versene-Lösung
SV	Sapporo-Virus
Tab.	Tabelle
TEMED	N', N', N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tm	Melting Temperature
U	Unit

.

UV	Ultraviolett
V	Volt
v	volume
VESV	Vesicular Exanthema of Swine Virus
vgl.	vergleiche
VLP	Virus-Like Particle
Vpg	Virus-proteine genome-linked
w	weight
xg	relative Zentrifugalbeschleunigung
x-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-ß-D-galaktopyranosid
z.B.	zum Beispiel

8.2 Abbildungsverzeichnis

8.2.1 Abbildungen

Abb. 1	Systematik der Caliciviren
Abb. 2	Elektronenmikroskopische Aufnahme von FCV
Abb. 3	Genomstruktur des FCV
Abb. 4	Replikationszyklus des FCV
Abb. 5	MVA/T7-Expressionssystem
Abb. 6	Schematische Darstellung der Protein-Protein-Co-Immunopräzipitation
Abb. 7	Schematische Darstellung des Plasmids pVQE60
Abb. 8	Schematische Darstellung des Plasmids pPQE30
Abb. 9	Zeitlicher Verlauf der prokaryotischen Protein-Expression von Vpg und 3D Polymerase
Abb. 10	Aufreinigung von Vpg und der 3D-Polymerase durch Immobilized Metal Affinity Chromatographie (IMAC)
Abb. 11	MVA/T7-Expressionssystem mit BSR-T7-Zellen
Abb. 12	Schematische Darstellung des Plasmids pcVmH
Abb. 13	Schematische Darstellung des Plasmids pcVI
Abb. 14	Schematische Darstellung des Plasmids pcPmH

.

Abb. 15 Schematische Darstellung des Plasmids pcPI
Abb. 16 Eukaryotische Expression der rekombinanten 3D-Polymerase und Vpg-Proteine
Abb. 17 Eukaryotische Expression der rekombinanten Kapsid (ORF2)- und ORF3-Proteine
Abb. 18 Überprüfung der Kaninchenseren
Abb. 19 Serumneutralisationstest mit Anti-Polymerase- bzw. Anti-Vpg-Kaninchenseren gegen FCV
Abb. 20 Untersuchung der zeitlichen Expression der 3D-Polymerase und des Vpg-Proteins im Replikationszyklus des FCV durch Western Blot-Analyse
Abb. 21 Untersuchung der zeitlichen Expression der 3D-Polymerase und des Vpg-Proteins im Replikationszyklus des FCV durch indirekte Immunfluoreszenz
Abb. 22 Untersuchung einer Protein-Protein-Interaktion zwischen Vpg und ORF2 sowie zwischen Vpg und der 3D-Polymerase
Abb. 23 Untersuchung einer Protein-Protein-Interaktion zwischen der 3D-Polymerase und ORF2, zwischen ORF3 und Vpg sowie zwischen ORF3 und der 3D-Polymerase

8.2.2 Tabellen

Tab. 1 Reaktionsansatz zur reversen Transkription
Tab. 2 Reaktionsansatz für die PCR
Tab. 3 Zyklusbedingungen der PCR
Tab. 4 Verwendete Primer zur Amplifikation der 3D-Polymerase- und Vpg Sequenzen von FCV-KS20 für die prokaryotische Protein-Expression
Tab. 5 Verwendete Primer zur Amplifikation der 3D-Polymerase- und Vpg Sequenzen von FCV-KS20 für die eukaryotische Protein-Expression

Danksagung

Diese Arbeit wurde am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München und am Tiergesundheitsdienst Bayern e.V. angefertigt.

Zunächst möchte ich mich ganz besonders bei Herrn Prof. Dr. Uwe Truyen für seine jederzeit gewährte fachliche und kollegiale Unterstützung bedanken.

Herrn Prof. Dr. Oskar-Rüger Kaaden, der mir einen Arbeitsplatz bereitstellte und die Durchführung dieser Arbeit unterstützte, bin ich zu großem Dank verpflichtet.

Mein herzlicher Dank geht an Dr. Klaus Geissler, Dr. Antonie Neubauer und Dr. Sandra Essbauer, die mir stets professionelle fachliche und freundschaftliche Unterstützung geboten haben.

Ein ganz besonderer Dank geht an Gabi Platzer, Andrea Jahnke, Gudrun Matschke, Grit Kermes, Astrid Freudenstein, Christine Brandmüller, Dr. Sabine Kühne, Michaela Reisige und Dana Wenzel, die mir immer bei vielen technischen und persönlichen Fragen zur Seite gestanden haben. Die Zusammenarbeit mit Euch war mir stets ein Vergnügen.

Pia Zimmermann, Dr. Christina Ziegler und Dr. Benjamin Etschmann, die mich in allen Situationen unterstützt und begleitet haben: vielen Dank für Eure Freundschaft.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, Dominik und meinen Freunden, die mir in jeder Weise geholfen haben und immer für mich da waren.

Lebenslauf

Judith Staber
Simsseestr. 12
83083 Riedering

Geburtsdatum:	05. Januar 1974	
Geburtsort:	Rosenheim	
Staatsangehörigkeit:	deutsch	
Schullaufbahn:	1980-1984:	Grundschule Riedering
	1984-1993:	Karolinen-Gymnasium, Rosenheim
Schulabschluß:	1993 Abitur	
Studium:	1994-2000:	Studium der Veterinärmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
	3. Staatsexamen:	22. August 2000
Approbation:	15. September 2000	
Promotion:	2001-2002:	Dissertationsarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München
	ab November 2002:	Dissertationsarbeit am Tiergesundheitsdienst Bayern e.V.

München, den 22. März 2003

Judith Staber