

**Untersuchung der molekularen  
Mechanismen der Zellschädigungen  
durch das cytopathogene Bovine  
Virusdiarrhoe Virus**

Vom Fachbereich Biologie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

**Dipl. Biol. Stefanie Bendfeldt**

geboren am 14. Juli 1973 in Kiel

Hannover 2003

**Wissenschaftliche Betreuung:** Apl. Prof. Dr. Irene Greiser-Wilke

**Referentin:** Apl. Prof. Dr. Irene Greiser-Wilke

**Koreferent:** Prof. Dr. Gerald Gerlach

**Tag der Disputation:** 07. Juli 2003

# Kurzfassung

## Untersuchung der molekularen Mechanismen der Zellschädigungen durch das cytopathogene Bovine Virusdiarrhoe Virus.

Das Bovine Virusdiarrhoe Virus (BVD-Virus) zählt innerhalb der Familie *Flaviviridae* zum Genus *Pestivirus* und stellt weltweit eine der wirtschaftlich bedeutsamsten Erkrankungen des Rindes dar. Anhand seines Verhaltens in der Zellkultur werden zwei verschiedene Biotypen unterschieden. Während das nichtcytopathogene (ncp) BVD-Virus keinerlei sichtbare Veränderungen hervorruft, führt die Infektion mit dem cytopathogenen (cp) BVD-Virus zum Zelltod durch Apoptose. Das Zusammenspiel der beiden Biotypen ist für das Verständnis der schwersten Verlaufsform der BVD-Virusinfektion, der *mucosal disease* (MD), von Bedeutung. Während die Infektion immunkompetenter Tiere in der Regel mit milden Krankheitssymptomen einhergeht, kann die Erstinfektion eines trächtigen Tieres in Abhängigkeit vom Immunstatus des Fetus zur Geburt persistent infizierter Kälber führen. Lediglich diese persistent infizierten Tiere erkranken im Verlauf ihres Lebens an MD. Aus den akut erkrankten Tieren sind beide Biotypen des BVD-Virus nachweisbar, die massiven Zerstörungen des Gastrointestinaltraktes korrelieren jedoch stets mit dem Vorkommen des cp BVD-Virus. Die Cytopathogenität des cp BVD-Virus wird mit der exklusiven Bildung des Nichtstrukturproteins NS3 in Verbindung gebracht, welches in mit ncp BVD-Virus infizierten Zellen lediglich in der nicht prozessierten Form des NS2-3 vorliegt. Die zellulären Mechanismen, die letztendlich den Tod der mit cp BVD-Virus infizierten Zellen *in vitro* und *in vivo* initiieren, sind, wie die Rolle des NS3, nur hinreichend bekannt. Doch auch ein anderes virales Genprodukt, das Glykoprotein E<sup>ms</sup> ist in der Lage, *in vitro* Apoptose in lymphoiden Zellen zu induzieren.

In dieser Arbeit wurde daher zunächst die potentiell proapoptotische Wirkung des E<sup>ms</sup> nach Expression in bovinen Zellen untersucht. Trotz vergleichbarer Lokalisation in der Zelle, konnte im Gegensatz zum Infektionsgeschehen kein E<sup>ms</sup> im Überstand nachgewiesen werden. Die stabile Expression des E<sup>ms</sup> aus dem cp BVD-Virusstamm NADL in bovinen Zellen zeigte, dass zellgebundenes E<sup>ms</sup> allein nicht in der Lage ist, Apoptose zu induzieren.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war die Betrachtung zellulärer Prozesse im Verlauf der Infektion mit BVD-Virus. Hier konnte mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen, enzymatischer Nachweisverfahren und spezifischer Antikörper gezeigt werden, dass die Infektion mit cp BVD-Virus zur Apoptoseinduktion über den *intrinsic pathway* führt, an dem die Mitochondrien als Schlüsselorganellen beteiligt sind.

Die Infektion boviner Zellen mit ncp BVD-Virus führte hingegen zu einer gesteigerten Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2. Sie scheint ein Schlüssel für die Etablierung einer persistierenden Infektion zu sein. Die Überexpression eines rekombinanten Bcl-2 murinen Ursprungs konnte das Auftreten des cytopathischen Effektes (CPE) deutlich verzögern.

Zusammenfassend deutet sich an, dass der persistenten Infektion durch das ncp BVD-Virus eine aktive Strategie zur Apoptoseinhibition zugrunde liegt, während die durch das cp BVD-Virus vermittelte Apoptoseinduktion ein „Unfall“ zu sein scheint.

Schlüsselwörter: BVD-Virus, Apoptose, *intrinsic pathway*



## Abstract

Bovine virus diarrhoea virus (BVD virus), a pestivirus of the *Flaviviridae* family, is an economically important cattle pathogen with a world wide distribution. Based on their behaviour in permissive cell cultures two biotypes of BVD virus can be distinguished. While the noncytopathic (ncp) biotype does not cause any visible alterations, infection of bovine cell cultures with the cytopathic (cp) BVD virus generally results in apoptotic cell death. The knowledge of the different consequences after infection of cells with the cp or the ncp biotype virus, respectively, is important for understanding the onset of the fatal *mucosal disease* (MD). While infection of immunocompetent animals generally leads to seroconversion and elimination of the virus, infection of the foetus before complete development of the immune system may lead to the birth of cattle persistently infected with the ncp BVD virus. Only these animals can succumb to MD. Both biotypes of BVD virus can be isolated cattle suffering from lethal MD. Nevertheless the cp BVD virus is mainly associated with the severe lesions in the gastrointestinal tract. The cytopathogenicity of cp biotype is thought to be correlated with the exclusive production of the NS3 nonstructural protein. In contrast, it is present only in its readthrough form NS2-3 in the corresponding ncp biotype. The cellular mechanisms which finally induce apoptosis after infection with cp BVD virus *in vitro* and *in vivo* as well as the role of NS3 or other viral proteins remain poorly understood. Previously, it was shown that recombinant E<sup>ms</sup> glycoprotein of pestiviruses also induces apoptosis *in vitro*.

In this study the potential proapoptotic function of E<sup>ms</sup> derived from different virus strains was analysed in bovine cell cultures. Although the localisation of the recombinant proteins was comparable to that of naturally infected cells, they could not be detected in the supernatant. Constitutive expression of E<sup>ms</sup> derived from cp BVD virus NADL showed that single expression of E<sup>ms</sup> is not able to induce apoptosis in bovine cells.

In the second part of the study was to analyse several cellular processes during infection with BVD virus were analysed. Using a colorimetric assay and a fluorescent dye on the one hand and specific antibodies on the other hand, induction of the *intrinsic pathway* including mitochondria as key organelles could be confirmed.

The results suggest that infection with ncp BVD virus includes a strategy to evade the host defence mechanisms leading to a persistent infection. It seems that the antiapoptotic Bcl-2 protein is involved as it was overexpressed in cells infected with ncp BVD virus acting directly at the mitochondrial level. Because cells which were constitutively overexpressing recombinant Bcl-2 protein, failed to be completely protected against infection with cp BVD virus, the way the ncp biotype inhibits apoptotic processes seems to be even more complex.

Summarising, it is becoming obvious that infection with ncp BVD virus involves active inhibition of apoptosis, and that induction of apoptosis due to cp BVD virus infection is rather accidental.

Key words: BVD virus, apoptosis, intrinsic pathway



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht.....</b>	<b>3</b>
2.1	Bovines Virusdiarrhoe Virus .....	3
2.1.1	Taxonomie .....	3
2.1.2	Biotypisierung und Genotypisierung .....	3
2.1.3	Morphologie und Genomorganisation .....	4
2.1.4	Die viralen Proteine .....	4
2.1.5	Infektionen mit dem BVD-Virus und <i>mucosal disease</i> .....	6
2.2	Zelltod durch Apoptose .....	7
2.2.1	Wege der Apoptoseinduktion .....	8
2.2.2	Manipulation der Apoptosekaskade durch Virusinfektionen .....	13
2.3	BVD-Virusinfektionen und Apoptose .....	17
<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>21</b>
3.1	Material.....	21
3.1.1	Zelllinien.....	21
3.1.2	Virusstämme .....	22
3.1.3	Bakterien.....	23
3.1.4	Antikörper.....	23
3.1.5	Substrate und Inhibitoren für den Nachweis der Caspasenaktivität .....	24
3.1.6	Vektoren.....	25
3.1.7	Sonstige Materialien .....	25
3.2	Methoden .....	25
3.2.1	Anzucht und Passage von Zellkulturen .....	25
3.2.2	Herstellung elektrokompetenter <i>E.coli</i> XL1 blue.....	26
3.2.3	Virusvermehrung und -ernte .....	26
3.2.4	Virustitration.....	27
3.2.5	Direkte Immunfärbung .....	27
3.2.6	Virusklonierung .....	28
3.2.7	Immunoplaquetest.....	29
3.2.8	Herstellung von Zelllysaten .....	29
3.2.9	Zellfraktionierung .....	30
3.2.10	Proteinbestimmung .....	31

3.2.11	Darstellung der Proteine mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	31
3.2.12	Western Blot.....	32
3.2.13	Immunfärbung.....	32
3.2.14	Analyse des mitochondrialen Transmembranpotentials $\Delta\Psi_m$ .....	33
3.2.15	Untersuchung der <i>permeability transition pore</i> .....	33
3.2.16	DNA-Leiteranalyse.....	35
3.2.17	Darstellung der Calcium-Verteilung.....	36
3.2.18	Enzymtests zum Nachweis der Caspasenaktivierung.....	36
3.2.19	Inhibition der Caspasenaktivierung.....	36
3.2.20	Bestimmung des Zeitpunktes erster Caspasenaktivität.....	37
3.2.21	Durchflusscytometrie zum Nachweis der Caspasenaktivierung.....	37
3.2.22	RNA-Isolierung.....	38
3.2.23	Reverse Transkription.....	38
3.2.24	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	38
3.2.25	Agarose-Gelelektrophorese.....	38
3.2.26	Aufreinigung der PCR-Produkte.....	38
3.2.27	Messung der DNA / RNA-Konzentrationen.....	39
3.2.28	Restriktionsverdau und Ligation.....	39
3.2.29	Elektroporation von Plasmid-DNA in <i>E.coli</i> XL1 blue.....	40
3.2.30	Kolonie-PCR.....	40
3.2.31	Plasmid-Isolierung.....	41
3.2.32	Sequenzierung von Plasmid-DNA mit nicht-markierten Primern.....	41
3.2.33	Auswertung der Gensequenzen und Ableitung der Proteinsequenz.....	42
3.2.34	Transfektion von Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen.....	43
3.2.35	Bestimmung der Transfektionseffizienz.....	43
3.2.36	ELISA zum Nachweis von rekombinantem $E^{ms}$ .....	43
3.2.37	Etablierung von stabil exprimierenden Zelllinien.....	44
3.2.38	Immunfluoreszenz.....	44
3.2.39	Charakterisierung der stabil exprimierenden Zellen.....	44
3.2.40	PCR und <i>real-time</i> PCR zum Nachweis der <i>bcl-2</i> -RNA.....	45
<b>4</b>	<b>Eigene Untersuchungen.....</b>	<b>47</b>
4.1	Untersuchung des $E^{ms}$ als potentieller Apoptoseinduktor.....	47
4.1.1	Klonierung und Sequenzierung des $E^{ms}$ -Gens.....	47
4.1.2	Transiente Expression und Lokalisation des rekombinanten $E^{ms}$ .....	50
4.1.3	Stabile Expression des $E^{ms}$ in bovinen Zellen.....	52
4.2	Charakterisierung des Apoptoseweges.....	52
4.2.1	Analyse des mitochondrialen Transmembranpotentials $\Delta\Psi_m$ .....	52
4.2.2	Beteiligung der <i>permeability transition pore</i> .....	53
4.2.3	Funktion des proapoptotischen Bax im Verlauf der BVD-Virusinfektion.....	57



---

4.2.4	Funktion des <i>second messengers</i> Calcium.....	59
4.2.5	Bildung des Apoptosoms .....	60
4.3	Untersuchung möglicher Inhibitionsstrategien des ncp BVD-Virus .....	62
4.3.1	Inhibition auf der exekutiven Ebene .....	62
4.3.2	Wirkung von Staurosporin auf die Infektion mit ncp BVD-Virus .....	67
4.3.3	Inhibition auf regulatorischer Ebene.....	68
4.3.4	Untersuchung der bcl-2-mRNA.....	68
4.3.5	Stabile konstitutive Bcl-2-Expression in PT-Zellen .....	69
4.3.6	Lokalisation des murinen Bcl-2 in PT-Zellen.....	71
4.3.7	Wirkung der BHV-1-Infektion auf Bcl-2-überexprimierende Zellen.....	73
4.3.8	Analyse des bcl-2-mRNA-Niveaus im Verlauf der BHV-1-Infektion ...	74
4.3.9	Wirkung der cp BVD-Virusinfektion auf Bcl-2-überexprimierende Zellen .....	75
4.3.10	Analyse des bcl-2-mRNA-Niveaus im Verlauf der cp BVD-Virusinfektion.....	77
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>79</b>
5.1	Einfluss des E <sup>rms</sup> auf bovine Zellkulturen.....	80
5.2	Apoptosekaskade in mit cp BVD-Virus infizierten Zellen.....	83
5.3	Strategien zur Apoptoseinhibition .....	87
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>91</b>
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>93</b>



## Abbildungsverzeichnis

Abb. 2-1: Lokalisation der Proteine des BVD-Virus auf dem viralen Genom.....	4
Abb. 2-2: Skizzierung der Apoptosewege .....	8
Abb. 2-3: Modellvorstellung der mitochondrialen PTP. ....	10
Abb. 2-4: Klassifizierung der Bcl-2-Familie .....	11
Abb. 2-5: Die wichtigsten Angriffspunkte viraler Genprodukte .....	14
Abb. 3-1: Strukturformel Cyclosporin A (Cyclo A) .....	34
Abb. 3-2: Strukturformel Decylubiquinone (DCU).....	34
Abb. 3-3: Strukturformel Ubiquinone 5 (Ub <sub>5</sub> ).....	35
Abb. 4-1: Abgeleitete Aminosäuresequenzen des E <sup>ms</sup> .....	49
Abb. 4-2: Transiente Expression des E <sup>ms</sup> in PT-Zellen .....	51
Abb. 4-3: Analyse des mitochondrialen Transmembranpotentials $\Delta\Psi_m$ .....	53
Abb. 4-4: Wirkung von DCU, Ub <sub>5</sub> bzw. Cylo A.....	54
Abb. 4-5: DNA-Leiteranalyse.....	55
Abb. 4-6: Nachweis von BVD-Virusantigen.....	56
Abb. 4-7: Untersuchung der Bax- und p53-Expression.....	57
Abb. 4-8: Nachweis der p53-Aktivierung in FKN-Zellen nach UV-Bestrahlung.....	58
Abb. 4-9: Untersuchung der Bax-Lokalisation.....	58
Abb. 4-10: Darstellung des freien Calciums.....	59
Abb. 4-11: Lokalisation des Cytochrom c.....	60
Abb. 4-12: Untersuchung der Apaf-1-Expression .....	61
Abb. 4-13: Colorimetrischer Nachweis der Caspase-9-Aktivität .....	62
Abb. 4-14: Nachweis der Caspasenaktivierung mittels Durchflusszytometrie.. ..	63
Abb. 4-15: Nachweis der Caspasenaktivierung.....	64
Abb. 4-16: Wirkung des Caspaseninhibitors Z-VAD-FMK.....	65
Abb. 4-17: Ermittlung des Virustiters in Abhängigkeit von Z-VAD-FMK .....	66
Abb. 4-18: Wirkung von Staurosporin auf die Infektion mit ncp BVD-Virus.....	67
Abb. 4-19: Untersuchung der Bcl-2-Expression.....	68
Abb. 4-20: PCR zum Nachweis von bcl-2-mRNA in BHV-1-infizierten PT-Zellen.....	69

---

Abb. 4-21: PCR zum Nachweis von bcl-2-RNA in BVD-virusinfizierten PT-Zellen....	69
Abb. 4-22: Aminosäuresequenzvergleich des Bcl-2-Proteins verschiedener Spezies. ....	70
Abb. 4-23: Nachweis der Bcl-2-Lokalisation mittels doppelter Immunfluoreszenz. ....	72
Abb. 4-24: Auswirkung der Infektion mit BHV-1 "Colorado" auf Bcl-2-überexprimierende Zellen.....	73
Abb. 4-25: Nachweis von bcl-2-RNA in BHV-1-infizierten Bcl-2-überexprimie- renden PT-Zellen .....	74
Abb. 4-26: bcl-2-mRNA-Niveau im Verlauf der BHV-1-Infektion .....	75
Abb. 4-27: Auswirkung der Infektion mit cp BVD-Virus auf Bcl-2-überexprimierende Zellen.....	76
Abb. 4-28: Nachweis von bcl-2-RNA in BVD-virusinfizierten Bcl-2-überexprimierenden PT-Zellen .....	77
Abb. 4-29: Untersuchung des bcl-2-mRNA-Niveaus im Verlauf der Infektion mit cp BVD-Virus.....	77
Abb. 5-1: Apoptoseweg in mit cp BVD-Virus infizierten Zellen.....	87

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Einfluss der Zellorganellen auf apoptotische Prozesse .....	13
Tabelle 2-2: Virale Strategien zur Manipulation der zellulären Abwehr .....	17
Tabelle 3-1: In dieser Arbeit verwendete Zellen .....	21
Tabelle 3-2: In dieser Arbeit verwendete Primärantikörper. ....	23
Tabelle 3-3: In der Arbeit verwendete Sekundärantikörper .....	24
Tabelle 3-4: Substrate und Inhibitoren für die Untersuchung der Caspasenaktivität. ....	24
Tabelle 3-5: Für die Untersuchung der PTP-Aktivität verwendete Substanzen. ....	34
Tabelle 3-6: Laufbedingungen für die Sequenzierung von Plasmid-DNA.....	42
Tabelle 4-1: Bezeichnung der einzelnen E <sup>ms</sup> -Konstrukte.....	48
Tabelle 4-2: Ermittlung der Transfektionseffizienz in den untersuchten Zellkulturen ..	50
Tabelle 4-3: Bestimmung des Virustiters in Abhängigkeit von DCU, Cyclo A bzw. Ub <sub>5</sub> . ....	57



## Anlagenverzeichnis

- Anlage 1: Der genetische Code  
Der ein-Buchstaben-Code der Aminosäuren
- Anlage 2: Medien und Lösungen für die Zellkultur
- Anlage 3: Medien und Lösungen für die Zellkultur
- Anlage 4: Medien und Lösungen für Bakterien
- Anlage 5: Primersequenzen
- Anlage 6: Primersequenzen, Thermoprofile
- Anlage 7: Thermoprofile
- Anlage 8: PCR-Mastermixansätze
- Anlage 9: PCR-Mastermixansätze
- Anlage 10: Reagenzien für die molekularbiologischen Arbeiten  
Kommerziell erhältliche Testsysteme
- Anlage 11: Puffer und Lösungen
- Anlage 12: Puffer und Lösungen
- Anlage 13: Puffer und Lösungen
- Anlage 14: Puffer und Lösungen, sonstige Chemikalien
- Anlage 15: Sonstige Chemikalien
- Anlage 16: Geräte und Gebrauchsgegenstände
- Anlage 17: Geräte und Gebrauchsgegenstände
- Anlage 18: Geräte und Gebrauchsgegenstände
- Anlage 19: Geräte und Gebrauchsgegenstände





## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AIF	<i>Apoptosis inducing factor</i>
ANT	Adeninnucleotidtranslocase
Apaf-1	<i>Apoptosis protease activating factor-1</i>
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest	<i>Aqua bidestillata</i> , zweifach destilliertes Wasser
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Bax	<i>Bcl-2-associated X-protein</i>
BCA	<i>Bicinchonic Acid</i>
Bcl-2	<i>B cell lymphoma 2</i>
Bcl-X	<i>B cell lymphoma-2-X</i>
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
BVD	Bovine Virusdiarrhoe
BVD-Virus	<i>Bovine Viral Diarrhea Virus</i> , Bovines Virusdiarrhoe Virus
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
cp	cytopathogen
CrmA	<i>Cytokine response modifier A</i>
CPE	Cytopathogener Effekt
CSF	<i>classical swine fever (Klassische Schweinepest)</i>
CSF-Virus	Virus der Klassischen Schweinepest
Cyclo A	Cyclosporin A
CyP-D	Cyclophilin-D

---

Cyt c	Cytochrom c
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindol
DCU	Decylubiquinone
ddNTPs	Didesoxynucleotidtriphosphate
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIF	Direkte Immunfärbung
DMEM	EMEM modifiziert nach Dulbecco und Freeman
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>didesoxy ribonucleic acid</i> (Desoxyribonucleinsäure)
DNA-PK	DNA-Proteinkinase
ds PKR	Doppelstrang-RNA-abhängige Proteinkinase
ds RNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMEM	<i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>
ER	Endoplasmatisches Reticulum
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
FADD	<i>Fas-Associated Death Domain-Protein</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKN	Fetale Kälbernieren
FKS	Fetales Kälberserum
FMK	Fluoromethylketon
GAMFITC	„goat anti mouse“-FITC-Konjugat
GAMPO	„goat anti mouse“-Peroxidase-Konjugat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
h	Stunde
HeLa	„Henrietta Lang“, humane permanente Zelllinie
IL-1 $\beta$	Interleukin 1 $\beta$
kb	Kilobasenpaare

---

kDa	Kilodalton
KID <sub>50</sub>	Kulturinfectiöse Dosis 50
l	Liter
μ	mikro (x 10 <sup>-6</sup> )
m	milli (x 10 <sup>-3</sup> )
M	Molarität
mA	Milliampère (10 <sup>-3</sup> Ampère)
mAk	monoklonaler Antikörper
MD	<i>Mucosal Disease</i>
MDBK	<i>Madin Darby Bovine Kidney</i>
min	Minuten
ml	Milliliter
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	messenger-RNA
MW	<i>Molecular Weight</i> Molekulargewicht
n	nano (x 10 <sup>-9</sup> )
NADL	<i>National Animal Disease Laboratory</i>
ncp	nichtcytopathogen
NFκB	<i>nuclear factor κB</i>
NTR	nicht translatierte Region
pAk	Polyklonales Antikörperserum
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PARPO	Pig-Anti-Rabbit-Peroxidase-Konjugat
PCD	<i>programmed cell death</i> (Programmierter Zelltod)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
p.i.	<i>post infectionem</i>
PLA	<i>Peroxidase Linked Assay</i>
pNA	pNitroanilide
PTP	<i>Permeability Transition Pore</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid

---

PRb	Riboblastom-Protein, ein Proto-Onkogen
RIPA-Puffer	<i>Radio-Immuno-Precipitation-Assay</i> -Puffer
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonucleinsäure)
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RS	Rinderserum
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunden
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	<i>Tris buffered Saline</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TR	TexasRed
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Tth	<i>Thermus thermophilus</i>
Ub <sub>5</sub>	Ubiquinone 5
UPR	<i>unfolded protein response</i>
UTR	<i>untranslated region</i> (nicht translatierte Region)
V	Volt
VDAC	<i>voltage dependent anion channel</i>
VE-Wasser	voll entionisiertes Wasser
WB	Western Blot
z.B.	zum Beispiel
ZKÜ	Zellkulturüberstand

# 1 Einleitung

Das Bovine Virusdiarrhoe Virus (BVD-Virus) gehört zum Genus Pestivirus innerhalb der Familie *Flaviviridae*. Anhand seines Verhaltens in permissiven Rinderzellkulturen werden zwei verschiedene Biotypen des BVD-Virus unterschieden: Der nichtcytopathogene (ncp) und der cytopathogene (cp) Biotyp. Während die Infektion mit dem ncp Biotyp weder zu makroskopisch noch zu mikroskopisch sichtbaren Veränderungen der infizierten Zellkulturen führt, induziert der cp Biotyp sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Zelltod durch Apoptose.

Die Infektion mit dem BVD-Virus ist mit unterschiedlichen Krankheitsbildern beim Rind assoziiert. Während die postnatale Infektion immunkompetenter Tiere in der Regel zu Serokonversion und Eliminierung des Virus führt, kann die pränatale Infektion vor der vollständigen Entwicklung des fetalen Immunsystems die Geburt von persistent infizierten Kälbern zur Folge haben. Nur diese persistent mit dem BVD-Virus infizierten Rinder können im Verlauf ihres Lebens an der als „*mucosal disease*“ (MD) bezeichneten tödlichen Verlaufsform der BVD-Virusinfektion erkranken. Während persistent virämische Tiere bis zur Erkrankung an MD lediglich mit dem ncp Biotyp infiziert sind, werden aus akut an MD erkrankten Tieren beide Biotypen isoliert. Ultrastrukturelle Untersuchungen an Geweben akut an MD erkrankter Tiere ergaben, dass die Lymphocyten in den Lymphknoten des Intestinaltraktes deutliche Merkmale der Apoptose aufwiesen. Die zellulären Mechanismen, die letztendlich den Tod der mit cp BVD-Virus infizierten Zellen *in vitro* und *in vivo* bewirken, sind bisher noch nicht ausreichend geklärt.

Ziel dieser Arbeit war es, die Wege der Apoptoseinduktion durch das cp BVD-Virus auf zellulärer Ebene *in vitro* zu untersuchen und die Unterschiede zur Infektion mit dem ncp BVD-Virus näher zu charakterisieren. Hierfür sollte zum einen die Expression und Lokalisation einzelner Proteine der Apoptosekaskade analysiert werden. Zum anderen sollten die möglichen Auswirkungen der BVD-Virusinfektion auf die Mitochondrien als Schlüsselorganellen im Verlauf der Apoptose untersucht werden. Des Weiteren sollte die potentielle proapoptotische Wirkung des Glykoproteins E<sup>ms</sup> näher betrachtet werden, um eventuelle Rückschlüsse auf dessen Funktion im Verlauf des Infektionsgeschehens *in vitro* ziehen zu können.



## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Bovines Virusdiarrhoe Virus

Das Bovine Virusdiarrhoe Virus (BVD-Virus) zählt weltweit zu den wirtschaftlich bedeutsamsten Infektionserregern des Rindes. Mindestens 80 % der über dreijährigen Rinder in Deutschland verfügen infolge einer BVD-Virusinfektion über neutralisierende Antikörper gegen das Virus (FREY et al., 1996). Mehr als zwei Prozent der deutschen Rinder sind persistent mit BVD-Virus infiziert. Diese Tiere spielen eine Schlüsselrolle im Geschehen der BVD-Virusinfektionen, da sie als permanente Virussauscheider ein unerkanntes Reservoir darstellen (LIESS, 1987).

#### 2.1.1 Taxonomie

Das BVD-Virus wird seit 1981 mit dem Border Disease-Virus der Schafe und dem Virus der Klassischen Schweinepest (CSF-Virus) dem Genus Pestivirus innerhalb der Familie *Flaviviridae* zugeordnet (WENGELER, 1991). Zur Familie der *Flaviviridae* zählen weiterhin das Genus Hepacivirus mit dem einzigen Vertreter Hepatitis C-Virus (HCV) und das Genus Flavivirus. Das Genus Flavivirus umfasst zahlreiche human-pathogene Viren, die durch Arthropoden übertragen werden. Die wichtigsten Vertreter sind das Gelbfieberevirus und das Frühsommermeningoencephalitis-Virus (FSME).

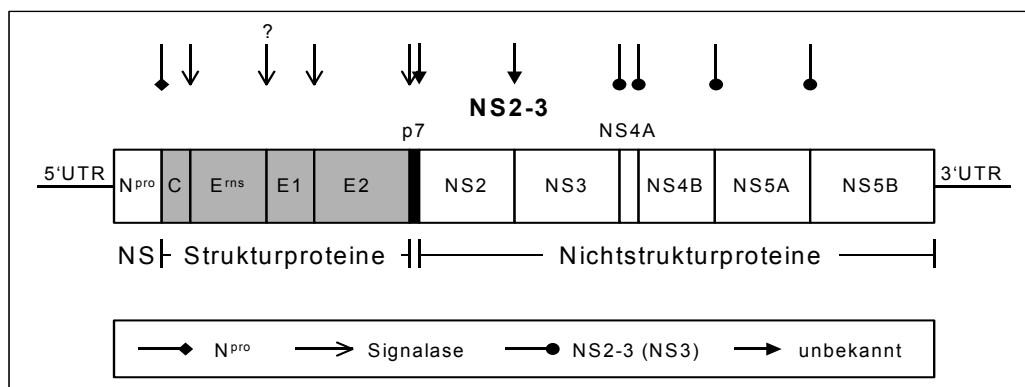
#### 2.1.2 Biotypisierung und Genotypisierung

Anhand des Verhaltens in der Zellkultur kann eine Einteilung in zwei verschiedene Biotypen vorgenommen werden. Nichtcytopathogene (ncp) BVD-Virusisolate lassen sich in einer permissiven Zellkultur vermehren, ohne dass in diesen makroskopisch oder mikroskopisch sichtbare Veränderungen hervorgerufen werden (BAKER et al., 1954). Die Infektion mit dem cytopathogenen (cp) BVD-Virus führt dagegen über eine Vakuolisierung, Abkuglung und Herauslösung der infizierten Zellen aus dem Zellverband letztlich zum Zelltod binnen weniger Tage (LEE und GILLESPIE, 1957; UNDERDAHL et al., 1957; GILLESPIE et al., 1960; LIESS, 1967).

Eine Charakterisierung der nichttranslatierten Region am 5'-Ende des BVD-Virusgenoms führte zunächst zu einer Einteilung in die zwei Genotypen BVD-Virus I und II (RIDPATH et al., 1994; HARPIN et al., 1995). Weiterführende Untersuchungen diesbezüglich mündeten im Jahr 2000 in der Postulierung zweier unterschiedlicher Virusspezies: BVD-Virus 1 und BVD-Virus 2 (VAN REGENMORTAL et al., 2000). Diese Einteilung ist jedoch gänzlich unabhängig vom jeweiligen Biotyp.

### 2.1.3 Morphologie und Genomorganisation

Die Viruspartikel der Pestiviren sind behüllt und weisen eine kubische Symmetrie auf. Der Durchmesser des Nucleocapsids beträgt etwa 40 – 60 nm (HAFEZ, 1967; MOENNIG, 1971). Das virale Genom liegt in Form einer einzelsträngigen RNA in Plusstrangorientierung mit einer durchschnittlichen Länge von 12,5 kb vor. Variationen bis zu 16,5 kb sind jedoch möglich. Es codiert in einem einzigen offenen Leserahmen (ORF) für ein hypothetisches Polyprotein von ca. 449 kDa (Abb. 2-1) (COLLETT et al., 1988a; COLLETT et al., 1988b). Dieser ORF wird von zwei nicht-translatierten Regionen (UTR) flankiert. Die Prozessierung der elf bzw. zwölf viralen Proteine erfolgt sowohl post- als auch kotranslational durch die Aktivität viraler und zellulärer Proteasen (COLLETT et al., 1991; WISKERCHEN et al., 1991; WISKERCHEN und COLLETT, 1991; RUMENAPF et al., 1993; STARK et al., 1993). Im N-terminalen Drittel des Polyproteins sind neben dem Nichtstrukturprotein N<sup>pro</sup> die Strukturproteine lokalisiert. Es folgen die Nichtstrukturproteine (NS) im C-terminalen Bereich.



**Abb. 2-1:** Lokalisation der Proteine des BVD-Virus auf dem viralen Genom und die möglichen Angriffspunkte viraler bzw. zellulärer Proteasen (nach Collett, 1994).

### 2.1.4 Die viralen Proteine

Das Genom der Pestiviren codiert vom 5'- zum 3'-Ende für die Proteine N<sup>pro</sup>, C, E<sup>ms</sup>, E1, E2, p7, NS2-3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B.

Am N-Terminus des BVD-Virusgenoms ist der für die Autoprotease N<sup>pro</sup> codierende Bereich lokalisiert (WISKERCHEN et al., 1991). Sie ist ein für Pestiviren charakteristisches Nichtstrukturprotein, scheint für die Virusreplikation jedoch nicht essentiell zu sein (TRATSCHIN et al., 1998). Ihre autoproteolytische Aktivität führt zur Freigabe des N-Terminus des Nucleocapsidproteins C. Dem C-Protein folgen die drei Hüll-Glykoproteine E<sup>ms</sup>, E1 und E2. Eine Signalsequenz zur Translokalisierung der Vorläuferproteine ist vorgeschaltet. Hier handelt es sich möglicherweise um einen C-terminalen Bestandteil des Nucleocapsidproteins. Die Prozessierung in die einzelnen Glykoproteine erfolgt ausschließlich durch zelluläre Proteasen. Alle Glykoproteine liegen sowohl in infizierten Zellen als auch in den Virionen als Dimere vor, die über



Disulfid-Brücken miteinander verbunden sind. Bisher konnten E<sup>ms</sup>-Homodimere, E1-E2-Heterodimere und E2-Homodimere nachgewiesen werden (STARK et al., 1990; WEILAND et al., 1990). Von den drei Glykoproteinen induzieren lediglich E2 und E<sup>ms</sup> die Bildung neutralisierender Antikörper, wobei das E2 immundominant ist (BOLIN et al., 1988; DONIS et al., 1988). Das Protein E1 dient wahrscheinlich als Membrananker für E2 (RUMENAPF et al., 1993). Das E2 hat eine wichtige Rolle in der Adsorption der Pestiviren inne. Als vermeintlicher Rezeptor wird ein nichtglykosyliertes Protein von 50 kDa vermutet, das auf der Zelloberfläche boviner Zellen nachgewiesen werden konnte (XUE und MINOCHA, 1996). Weitere Untersuchungen postulieren das Oberflächenmolekül CD 46 als potentiellen Rezeptor (MAURER et al., 2000). Die proteolytische Spaltung des E2 ist nicht immer vollständig, weshalb es zur Entstehung von zwei Formen des E2 kommen kann: E2 und E2p7 (ELBERS et al., 1996). Ob die Expression dieses Proteins einen Einfluss auf das Infektionsgeschehen hat, wurde bisher nicht geklärt. Das Protein p7 wurde bislang nur in infizierten Zellen, jedoch nicht in Virionen gefunden. Seine Funktion im Verlauf der Replikation ist unbekannt. Auch die Protease, welche die Spaltung des p7 von den NS vollzieht, ist bisher unbekannt.

Die NS befinden sich im C-terminalen Bereich des Polyproteins. Im Gegensatz zu den Strukturproteinen ist die Lokalisierung der NS auf dem hypothetischen Polyprotein nur ungenau festgelegt. Dem ersten Genprodukt NS2-3 mit einem Molekulargewicht von ca. 125 kDa kommt beim BVD-Virus eine besondere Bedeutung zu. Es wird von allen mit einem Pestivirus infizierten Zellen exprimiert und verfügt neben einer Serin-Protease-Aktivität auch über eine RNA-Helicase- und RNA-abhängige NTPase-Aktivität (WISKERCHEN und COLLETT, 1991; TAMURA et al., 1993; WARRENER und COLLETT, 1995). Zellen, die mit cp BVD-Virus infiziert sind, exprimieren zusätzlich ein 80 kDa-Protein, das hydrophile NS3, welches kolinear mit dem C-terminalen Ende des NS2-3-Proteins ist (GREISER-WILKE et al., 1992). Das NS3 wird in mit ncp BVD-Virus infizierten Zellen nicht gefunden. Es gilt damit als Charakteristikum für cp BVD-Viren. Die Unterscheidung der beiden Biotypen kann dementsprechend auch anhand der Prozessierung des NS2-3 in das NS2 und das NS3 erfolgen. Das NS3 verfügt wie das NS2-3 über eine Serin-Protease-, RNA-Helicase- und RNA-abhängige NTPase-Aktivität. Ob es allein die Cytopathogenität der cp Biotypen bedingt, ist noch nicht eindeutig geklärt (BRUSCHKE et al., 1997; KUMMERER und MEYERS, 2000a).

Die Entstehung des NS3 hat verschiedene Ursachen, die von Stamm zu Stamm variieren. So konnte beispielsweise für die cp BVD-Viren Osloss und CP14 die Insertion eines bovinen Ubiquitin-Gens nachgewiesen werden (MEYERS et al., 1989; MEYERS et al., 1991b). Das Genom des cp BVD-Virus NADL enthält im Bereich des NS2-3 eine Insertion aus dem Genom der Wirtszelle, deren Herkunft nicht geklärt ist (MEYERS et al., 1989; GREISER-WILKE et al., 1993). Auch Duplikationen des NS3, wie z.B. bei CP1 wurden gezeigt (QI et al., 1992). Sie sind wahrscheinlich ein auslösender Faktor für die Expression des NS3 in mit cp BVD-Virus infizierten Zellen. Deletionen und Punktmutationen (cp BVD-Virus Oregon) im Bereich des NS2-3 führen

möglicherweise ebenfalls zur Prozessierung in NS2 und NS3. Die für diese Spaltung verantwortliche Protease wurde bisher nicht identifiziert. Wahrscheinlich ist sie jedoch zellulären Ursprungs. Im Gegensatz zum NS3 ist die Funktion des NS2 nur unzureichend untersucht. Es ist ein hydrophobes Protein mit einem Molekulargewicht von 54 kDa. Seine Rolle während der Virusreplikation ist auch aufgrund seiner geringen Halbwertszeit nicht bekannt. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass es, obwohl es für die Replikation nicht essentiell ist, wahrscheinlich eine regulatorische Funktion hat (MOSER et al., 1999). Eine Verbindung zur Apoptoseinduktion wird vermutet (KUMMERER und MEYERS, 2000b).

Das dem NS2-3 Protein folgende Nichtstrukturprotein NS4 wird durch die Proteaseaktivität von NS2-3 (NS3) abgespalten und im Anschluss daran in die Proteine NS4A und NS4B prozessiert (COLLETT et al., 1991). Über die Funktion dieser Genprodukte ist bisher nur wenig bis gar nichts bekannt. Vergleichende Untersuchungen des NS4A des HCV zeigten, dass NS4A als Cofaktor der Protease NS3 fungiert und mit ihr und dem NS5B einen Komplex bildet, der möglicherweise eine bedeutende Rolle bei der Virusreplikation spielt. *In vitro*-Studien ergaben hier, dass die Aktivität der Protease NS3 ohne NS4A um ein Vielfaches sinkt und die Spaltung des NS5A vom NS4B nicht stattfindet. NS4A stabilisiert NS3 zusätzlich und erhöht damit die Halbwertszeit der Protease (HAHM et al., 1995; TANJI et al., 1995; NEDDERMANN et al., 1997; ISHIDO et al., 1998; SALI et al., 1998). Für Pestiviren wurden ähnliche Funktionen des NS4A postuliert (TAUTZ et al., 2000).

NS5 wird ebenfalls durch NS2-3 in die beiden Proteine NS5A und NS5B prozessiert (COLLETT et al., 1988b; COLLETT et al., 1991). NS5B besitzt ebenfalls eine RNA-abhängige RNA-Polymerase-Aktivität (WARRILOW et al., 2000). Aufgrund seiner vergleichsweise geringen Halbwertszeit stellt das Genprodukt NS5A wahrscheinlich den limitierenden Faktor bei der Virusreplikation dar. Seine Funktion ist bisher noch unklar, vergleichende Untersuchungen des NS5A des HCV lassen jedoch auf eine regulatorische Funktion während der Transkription einiger zellulärer Gene und bei der Ausbildung von Hepatokarzinomen schließen (REED et al., 1998b). Auch eine Funktion in Verbindung mit der IFN- $\gamma$ -Resistenz von HCV wird vermutet (HERION und HOOFNAGLE, 1997).

### **2.1.5 Infektionen mit dem BVD-Virus und *mucosal disease***

Das BVD-Virus wurde 1946 erstmals von Olafson et al. (OLAFSON et al., 1946) mit dem Auftreten von Symptomen wie blutigem Durchfall, Fieber, Nasenausfluss und Dehydratation beim Rind in Verbindung gebracht und als „*Bovine Viral Diarrhea*“ (BVD) bezeichnet. Das BVD-Virus kann beim Rind jedoch zu unterschiedlichen Krankheitsbildern führen, die u.a. in einem engen Verhältnis zum Immunstatus und Alter des betroffenen Tieres stehen. Hierzu zählen die mit meist mildem Krankheitsverlauf einhergehende BVD nach postnataler Infektion (BAKER et al., 1954; BOLIN, 1993), das hämorrhagische Syndrom (BOLIN und RIDPATH, 1992; LIEBLER-

TENORIO et al., 1995), Fruchtbarkeitsstörungen und Aborte, Missbildungen des zentralen Nervensystems bei Kälbern sowie perakute Todesfälle (CASARO et al., 1971; LIESS et al., 1987; FREY et al., 1996). Als schwerste Verlaufsform gilt die als „*mucosal disease*“ (MD) bezeichnete Erkrankung in ihrer Früh- und Spätform (MOENNIG et al., 1990; FRITZEMEIER et al., 1997). Bei einer Erstinfektion des Muttertieres ist die transplazentare Infektion des Fetus die Regel. Feten immuner Tiere sind vor einer solchen transplazentaren Infektion geschützt (CASARO et al., 1971). Der Grundstein für eine spätere Erkrankung an MD wird bereits im Verlauf der Trächtigkeit des Muttertieres gelegt, wobei dem Zeitpunkt der Infektion eine bedeutende Rolle zukommt. Erfolgt die Erstinfektion mit dem BVD-Virus nach dem 120. Tag der Trächtigkeit, ist das fetale Immunsystem bereits vollständig entwickelt. Sowohl das Muttertier als auch der Fetus bilden infolge der Infektion neutralisierende Antikörper und eliminieren das Virus (LIESS et al., 1984).

Erfolgt die Erstinfektion des Muttertieres hingegen vor Ausbildung der Immunkompetenz, so entwickelt der Fetus eine spezifische Immuntoleranz gegen das Virus, was zu einer persistenten Infektion führt. Die Kälber kommen persistent mit dem ncp Biotyp infiziert auf die Welt und scheiden das Virus zeitlebens aus. Dieser Biotyp ist im gesamten Organismus nachweisbar. Nur diese persistent infizierten Kälber können im Laufe ihres Lebens an MD erkranken (LIESS et al., 1974; ROEDER und DREW, 1984). Im Verlauf der Erkrankung ist auch der cp Biotyp nachweisbar. Das Vorkommen des cp BVD-Virus korreliert immer mit den Zellzerstörungen im Magen-Darm-Trakt (LIEBLER et al., 1991; LIEBLER-TENORIO et al., 1997). Die MD ist durch hochgradige Erosionen und Ulzerationen der Schleimhäute und des gesamten Verdauungstrakts gekennzeichnet. Im Endstadium tritt eine massive Zerstörung des Darmepithels und des Darmschleimhautimmunsystems auf, so dass das Krankheitsbild durch Sekundärinfektionen noch verschlimmert wird. Die Tiere verenden in der Regel innerhalb von zwei Wochen nach Auftreten der ersten Krankheitssymptome (RAMSEY und CHIVERS, 1953; PRITCHARD, 1963).

## 2.2 Zelltod durch Apoptose

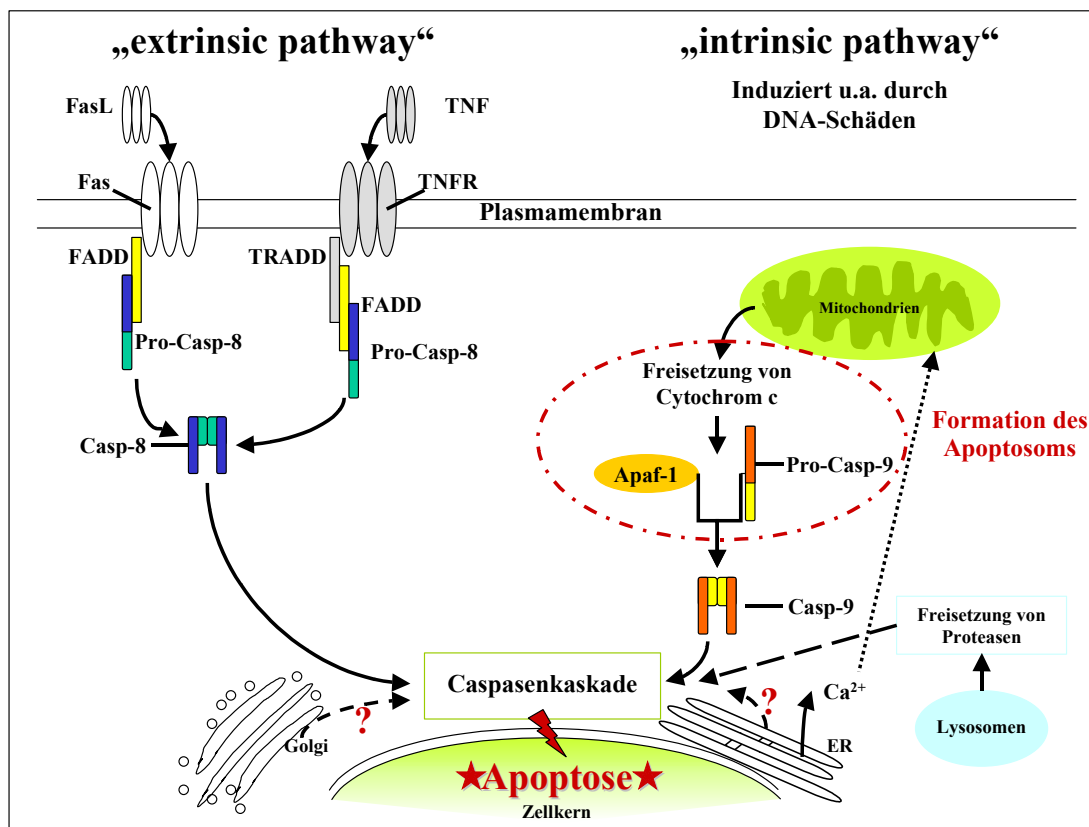
Der programmierte Zelltod (PCD) stellt einen hochgradig regulierten und konservierten biochemischen Prozess dar, der unwiderruflich zum Tod der Zelle führt. Generell können drei Kategorien unterschieden werden. Zum einen die im Jahr 1972 zum ersten Mal beschriebene Apoptose (KERR et al., 1972), zum anderen der apoptoseähnliche PCD und der nekroseähnliche PCD. Der Zelltod durch Apoptose ist vornehmlich durch Kondensation des Chromatins, Fragmentierung der DNA, *membrane blebbing*, Schrumpfen der Zelle und Abschnüren der stets von Membranstrukturen umgebenen apoptotischen Körperchen oder *apoptotic bodies* gekennzeichnet. Der apoptoseähnliche PCD zeigt einige der beschriebenen Charakteristika, die Kondensation des Chromatins unterbleibt jedoch vollständig. Der nekroseähnliche PCD ist durch das generelle Fehlen der Chromatinkondensation charakterisiert ist, jedoch wegen einer ihn induzierenden

Signaltransduktionskaskade deutlich von der eigentlichen Nekrose zu differenzieren (LEIST und JAATTELA, 2001).

Der Zelltod durch Apoptose ist momentan am besten charakterisiert. Er erfüllt eine zentrale Funktion im multizellulären Organismus, da über diesen Mechanismus neben der Homöostase der Zellzahl auch die Embryogenese sowie die Bildung und Aktivierung des Immunsystems reguliert werden. Eine Dysregulation dieses Stoffwechselweges hat für den Organismus schwerwiegende Folgen. So wird eine fehlende Apoptoseinitiation mit Krebserkrankungen in Verbindung gebracht (THOMPSON, 1995). Ein verstärktes Auftreten apoptotischer Prozesse kann möglicherweise in Krankheiten wie Alzheimer resultieren (BARINAGA, 1998).

### 2.2.1 Wege der Apoptoseinduktion

Das Signal zur Apoptoseinduktion erfolgt prinzipiell entweder durch ein externes Signal oder wird durch Ereignisse in der Zelle selbst gegeben. Dementsprechend wurden die Begriffe „*extrinsic pathway*“ und „*intrinsic pathway*“ geprägt. Die Abläufe sind schematisch vereinfacht in Abb. 2-2 zusammengefasst.



**Abb. 2-2:** Skizzierung der Apoptosewege. Abhängig vom induzierenden Signal wird der „*extrinsic pathway*“ vom „*intrinsic pathway*“ unterschieden. Der „*extrinsic pathway*“ wird durch die Bindung eines Liganden an seinen Zelloberflächenrezeptor initiiert, während der „*intrinsic pathway*“ durch charakteristische Änderungen in den Mitochondrien gekennzeichnet ist. Beide Wege sind auf vielen Ebenen miteinander verknüpft, so dass eine strikte Trennung nicht möglich ist. Ihnen gemein ist die Aktivierung der Caspasenkaskade.

Eine eindeutige Trennung ist jedoch nicht immer möglich, da auch Kreuzungspunkte existieren (RASPER et al., 1998; FERRI und KROEMER, 2001a).

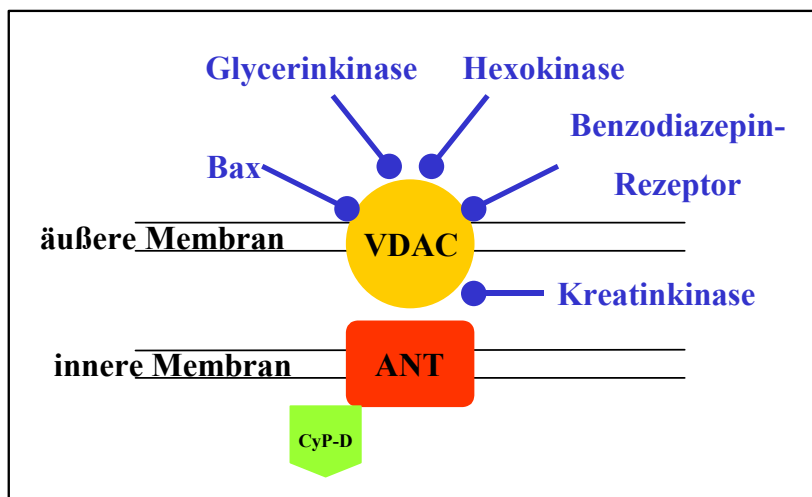
Charakteristikum des *extrinsic pathway* ist die Bindung eines Liganden an seinen Rezeptor an der Zelloberfläche. Am besten untersucht ist die hier dargestellte Reaktion zwischen Fas (CD95) und FasL bzw. zwischen TNFR und TNF. Beide Rezeptoren sind unter physiologischen Bedingungen über die Aktivierung diverser Kinasenkaskaden an der Regulation der Expression von Proteinen beteiligt, die das Überleben der Zelle sichern sollen. Die Bindung des Liganden führt zu einer Trimerisierung des Rezeptors. Intrazellulär lagern sich Adaptermoleküle an (FADD, TRADD), die für die Aktivierung der als „Motoren“ der Apoptose bezeichneten Caspasen notwendig sind. Die stetig wachsende Familie der Aspartat-spezifischen Cystein-abhängigen Proteasen, heute als „Caspasen“ bezeichnet, besteht aus mittlerweile 14 Mitgliedern (COHEN, 1997; CREAGH und MARTIN, 2001). Sie bilden als Effektor- und Regulatormoleküle eine eigene wichtige Kaskade innerhalb der Apoptosekaskade. Die genetische Information scheint in vielen Organismen konserviert zu sein (COHEN, 1997). Zwischen den einzelnen Caspasen bestehen jedoch Unterschiede einerseits in Größe und Struktur, andererseits in der Substratspezifität, weshalb auch Gewebespezifitäten und abweichende Lokalisierungen innerhalb der Zelle vermutet werden (VILLA et al., 1997). Caspasen liegen in nicht-apoptotischen Zellen als inaktive Proenzyme vor, bestehend aus einer Prodomäne, einer großen und einer kleinen Untereinheit. Das aktive Enzym ist ein aus zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten gebildetes Heterotetramer und entsteht entweder durch Autoproteolyse oder durch andere Proteasen (VILLA et al., 1997).

Die Apoptoseinduktion über den *extrinsic pathway* führt als erstes zur autoproteolytischen Aktivierung der Caspase-8. Diese aktiviert ihrerseits insbesondere die als Schlüsselenzym wirkende Effektorcaspase-3, welche letztendlich die Degradierung der zellulären Struktur einleitet und im Zelltod mündet (NAGATA und GOLSTEIN, 1995; ENARI et al., 1996; MUZIO et al., 1996; RASPER et al., 1998).

Anders verhält es sich, wenn das Signal zur Apoptoseinduktion von der Zelle selbst gegeben und damit der *intrinsic pathway* initiiert wird. Dies geschieht beispielsweise nach irreparablen Schäden der DNA oder oxidativem Stress. Solche physiologischen und pathologischen Signale führen lange vor dem Auftreten erster Apoptosemerkmale zu signifikanten Änderungen in den Mitochondrien und resultieren im Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials  $\Delta\Psi_m$  (GREEN und REED, 1998; SUSIN et al., 1998; HALESTRAP et al., 2000; FERRI und KROEMER, 2001a). Mit diesem Ereignis ist der Verlust des gesamten Energiestoffwechsels untrennbar verknüpft, dessen Folge die irreversible Permeabilisierung des mitochondrialen Membransystems ist. Diese ermöglicht den unkontrollierten Influx von cytosolischem Calcium und eine Akkumulation in der Mitochondrienmatrix. Das Einströmen von Calcium lässt die Mitochondrien anschwellen, wodurch die Freisetzung von mitochondrialen Proteinen in das Cytosol initiiert wird. Zu diesen Proteinen zählen der „*apoptosis inducing factor*“ (AIF) und Cytochrom c (Cyt c) (ARNOULT et al., 2002). Die Translokation des Cyt c

stellt ein Schlüsselereignis des *intrinsic pathway* dar (SKULACHEV, 1998). Erst jetzt kann durch die temporäre Komplexbildung von Cyt c, Apaf-1 („*apoptosis protease inducing factor 1*“) und der Procaspase-9 zum Apoptosom die Caspasenkaskade aktiviert und damit die Degradierung der Zelle eingeleitet werden (CHINNAIYAN, 1999).

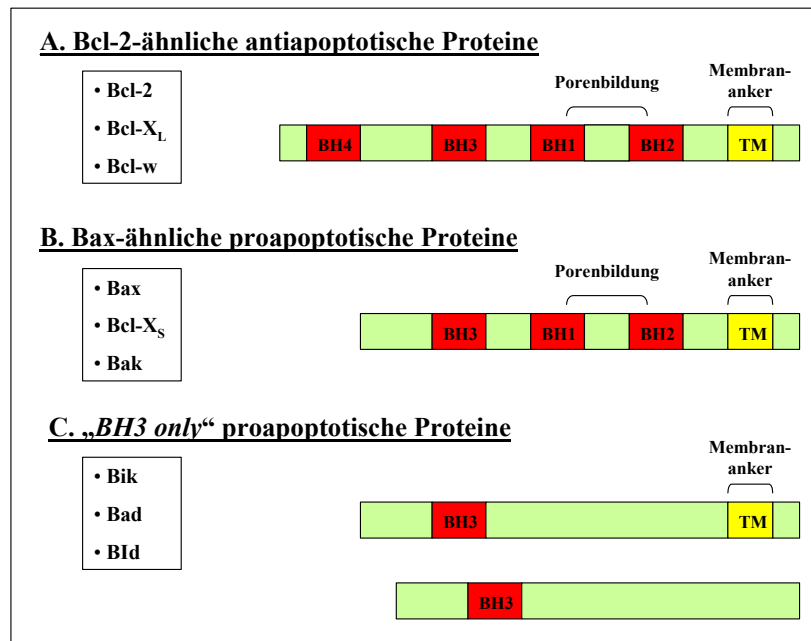
Einen wesentlichen Anteil an dem Geschehen trägt die „*permeability transition pore*“ (PTP) (CROMPTON, 1999). Die PTP besteht aus einem dynamischen Multiproteinkomplex, dessen Struktur und Zusammensetzung bisher erst teilweise erfasst wurden. Eine Modellvorstellung der PTP ist in Abb. 2-3 dargestellt. Zu den Komponenten zählen sowohl Proteine der inneren Mitochondrienmembran wie die Adeninnucleotidtranslocase (ANT), als auch Proteine der äußeren Mitochondrienmembran wie der *voltage dependent anion channel* (VDAC) (CROMPTON et al., 1998; BAUER et al., 1999). Diese agieren gemeinsam über Kontaktstellen und bilden auf diese Weise eine Pore, die für Moleküle  $\leq 1,5$  kDa durchlässig ist. Auch das in der Mitochondrienmatrix lokalisierte Cyclophilin-D (CyP-D) ist an der Konstruktion der PTP beteiligt (CROMPTON, 1999). Weitere mögliche jedoch nicht-essentielle Komponenten sind Bax, die Glycerinkinase, die Hexokinase, die Kreatinkinase und der Benzodiazepinrezeptor (ESKES et al., 1998; HALESTRAP et al., 2000). Unter physiologischen Bedingungen ist die PTP sowohl an der Regulation des mitochondrialen pH und des  $\Delta\Psi_m$  als auch an der des Calcium-Stoffwechsels beteiligt (CROMPTON, 1999).



**Abb. 2-3:** Modellvorstellung der mitochondrialen PTP (CROMPTON, 1999). Die Grundstruktur wird von Cyclophilin-D, der Adeninnucleotidtranslocase und dem „*voltage dependent anion channel*“ gebildet. Zusätzlich können weitere Komponenten wie Bax oder die Kreatinkinase an der Porenbildung beteiligt sein.

Als Regulatoren der PTP gelten u.a. die Mitglieder der Bcl-2-Familie. Hierzu zählen mittlerweile über 18 Proteine mit dem Bcl-2-Protein als Prototyp (ADAMS und CORY, 1998; KORSMEYER, 1999; ANTONSSON und MARTINOU, 2000). Sie werden sowohl in Säugetieren als auch in niederen Organismen exprimiert und weisen unterein-

ander in mindestens einer von vier Domänen (*Bcl-2 Homology* BH1 bis BH4) Homologien auf (ADAMS und CORY, 1998). Anhand ihrer regulatorischen Eigenschaften werden eine antiapoptotische und zwei proapoptotische Gruppen unterschieden (REED et al., 1998a). Sie sind schematisch in Abb. 2-4 abgebildet.



**Abb. 2-4:** Klassifizierung der Bcl-2-Familie. Die Proteine werden anhand ihrer regulatorischen Funktion in eine antiapoptotische und zwei proapoptotische Gruppen unterteilt. Allen ist die BH3-Domäne gemeinsam. Darüber hinaus verfügen einige Mitglieder über weitere BH-Domänen (BH1, BH2 und BH4) sowie einen Transmembrananker.

Während Bcl-2 selbst antiapoptotische Wirkung zeigt, fördert Bax ebenso wie Blk, ein Mitglied der „BH-3 only“-Gruppe, die Apoptoseinduktion (HEGDE et al., 1998). Die genauen Wirkmechanismen sind bisher noch unbekannt. Eine Regulation über das Verhältnis von pro- und antiapoptotisch wirksamen Proteinen zueinander sowie eine Interaktion mittels Dimerisierung ist allerdings wahrscheinlich (OLTVAI et al., 1993; VANDER HEIDEN und THOMPSON, 1999; SUZUKI et al., 2000).

Wie aus Abb. 2-2 weiterhin ersichtlich, betreffen die für den Zelltod durch Apoptose charakteristischen Veränderungen in der Zelle nicht nur den Zellkern und die Mitochondrien. Entgegen früheren Annahmen sind auch andere Zellorganellen aktiv an der Apoptosekaskade beteiligt, auch wenn sie im Gegensatz zum Kern morphologisch intakt bleiben.

In den Membranen des **Golgi-Apparates** und der **Endosomen** sind diverse Proteine der Apoptosekaskade angereichert. Unter anderem finden sich hier Rezeptormoleküle wie der Tumornekrosefaktor-1-Rezeptor (TNFR1) oder CD95, die normalerweise an der Zelloberfläche lokalisiert sind (BENNETT et al., 1998). Auch die GD3-Synthase ist mit dem Golgi-Apparat assoziiert. Sie wandelt Ceramide in GD3 um, welche die PTP-

Öffnung in den Mitochondrien forcieren können (RIPPO et al., 2000a; RIPPO et al., 2000b).

Die **Lysosomen** enthalten viele Hydrolasen und Proteasen, die in die Apoptoseinduktion involviert sind (LI et al., 2000). Eine wichtige Rolle spielen hier die Cathepsine (DEISS et al., 1996). Auch die Bildung von Ceramiden durch die lysosomale Sphingomyelinase scheint einen Einfluss auf die apoptotischen Prozesse nehmen zu können (HEINRICH et al., 1999). Viele Funktionen lysosomaler Proteine sind jedoch bisher noch nicht geklärt.

Das **Endoplasmatische Reticulum** (ER) ist an der Apoptoseinitiation über zwei unterschiedliche, jedoch eng miteinander verknüpfte Mechanismen beteiligt, zum einen die „*unfolded protein response*“ (UPR), zum anderen über den *second messenger* Calcium. Die Akkumulation nicht gefalteter Protein am ER führt zu einer Aktivierung der Serin/Threonin-Kinasen Ire1- $\alpha$  und Ire1- $\beta$ . Sie inhibieren durch ihre Ribonucleaseaktivität (Verdau der 28S rRNA) die Proteintranslation und initiieren zudem diverse Signalkaskaden (KAUFMAN, 1999; PATIL und WALTER, 2001). Auch die im ER lokalisierten Transmembranproteine PERK und ATF-6 werden infolge der UPR aktiviert und sind durch ihren Einfluss auf den Translationsinitiationsfaktor eIF2- $\alpha$  ebenfalls für den Stopp der Translation verantwortlich (PATIL und WALTER, 2001). Die Funktion der an der cytoplasmatischen Seite des ER lokalisierten Caspase-12 ist bisher nur unzureichend geklärt. Sie wird infolge von ER-Stress durch Calpain aktiviert und könnte das potentielle Bindeglied zwischen dem ER und der Aktivierung der Caspasenkaskade darstellen (NAKAGAWA und YUAN, 2000; NAKAGAWA et al., 2000; YONEDA et al., 2001).

Der Botenstoff Calcium liegt im ER entweder frei oder gebunden an luminaire Proteine vor, wie z.B. Calreticulin und Calnexin. Oszillationen der Calcium-Konzentration sind ein wesentlicher Bestandteil der Regulation normaler Stoffwechselwege (BERRIDGE et al., 2000). Die Freisetzung von Calcium infolge von ER-Stress führt unweigerlich zur Beeinflussung der mitochondrialen Aktivität (SZALAI et al., 1999; HACKI et al., 2000).



Die Funktionen der Zellorganellen im Verlauf apoptotischer Prozesse sind nochmals in Tabelle 2-1 zusammengefasst.

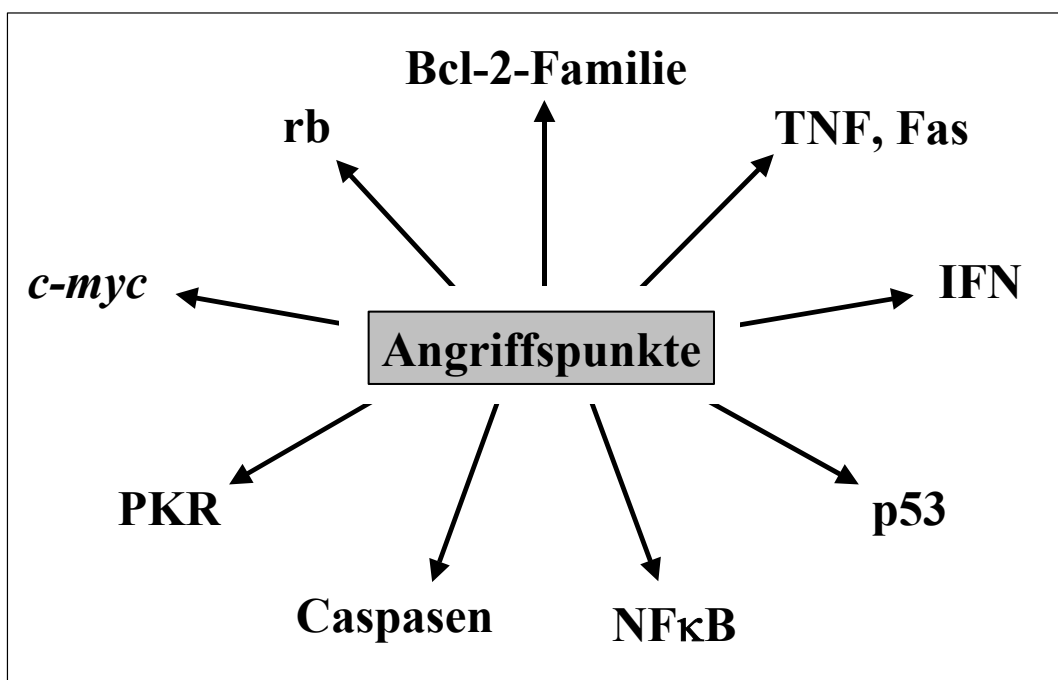
<b>Organelle</b>	<b>Spezifische Sensoren</b>	<b>Lokale Reaktion</b>	<b>Resultat</b>
<b>Golgi-Apparat</b>	?	Caspase-2-Aktivierung CD95-Transport zur Plasmamembran Aktivierung der GD3-Synthase	Caspasenaktivierung? Erleichterung der CD95-Signalkaskade GD3-bedingte PTP-Öffnung
<b>Lysosomen</b>	?	Cathepsin-Aktivierung u. -Translokation Sphingomyelinase-Aktivierung Bildung von Ceramiden	Caspasenaktivierung? Bid-Spaltung PTP-Öffnung
<b>ER</b>	Ire1- $\alpha$ , Ire1- $\beta$ , ATF-6	Verdau der 28S rRNA Calcium-Freisetzung Caspase-12-Aktivierung	Translationsinhibition Ca <sup>2+</sup> -bedingte PTP-Öffnung Caspasenaktivierung
<b>Mitochondrien</b>	Bcl-2-Familie PTP	Öffnung der PTP ROS-Bildung	Freisetzung von Signalmolekülen (u.a. Cyt c, AIF)
<b>Nucleus</b>	Durch DNA-Schädigung aktivierte Enzyme	p53-Aktivierung	Verstärkte Bildung proapoptischer Proteine der Bcl-2-Familie Bildung von ROS-generierenden Enzymen

**Tabelle 2-1:** Einfluss der Zellorganellen auf apoptotische Prozesse.

### 2.2.2 Manipulation der Apoptosekaskade durch Virusinfektionen

Die Apoptoseinduktion infolge einer Virusinfektion ist ein weitverbreiteter Abwehrmechanismus des Wirtsorganismus, um sowohl Virusreplikation als auch Virusausbreitung zu verhindern. Viele Viren haben unterschiedlichste Strategien entwickelt, um diese Antwort der Zielzelle auf die Infektion für ihre eigenen Zwecke zu missbrauchen. Die Beeinflussung der Apoptose ermöglicht den Viren eine optimale Gestaltung der Replikation. Außerdem sind Viruspartikel, die sich in den *apoptotic bodies* befinden, vor dem Immunsystem maskiert und verfügen nach Phagozytose über einen alternativen

Infektionsweg. Basierend auf der Strategie können drei Virusgruppen unterschieden werden: Im ersten Fall führt die Virusinfektion zu einer Aktivierung der Apoptosekaskade und zur Induktion des Zelltodes, welcher eine effiziente Freisetzung und Verbreitung neuer infektiöser Viruspartikel ermöglicht. Andere Viren wie z.B. das Kuhpockenvirus unterdrücken zelluläre Signale für die Apoptoseinduktion und verlängern dadurch die Zeit für die Virusreplikation (MIURA et al., 1995; MACEN et al., 1998). Am Beispiel der Adenoviren konnte gezeigt werden, dass Viren durch die Aktivität unterschiedlicher viraler Genprodukte Apoptose sowohl inhibieren als auch induzieren können (PEREZ und WHITE, 1998; BRAITHWAITE und RUSSELL, 2001; SUNDARARAJAN et al., 2001). Die Auswahl potentieller Angriffspunkte ist vielfältig. Sie sind in Abb. 2-5 zusammengefasst.



**Abb. 2-5:** Die wichtigsten Angriffspunkte viraler Genprodukte. Sie umfassen u.a. Protoonkogene und Zelloberflächenrezeptoren sowie weitere regulatorisch wirkende Proteine.

Das humane Protoonkogen *c-myc* zählt zu einer Onkogen-Familie, die in diversen Spezies hoch konserviert vorliegt. Die Expression seines Genproduktes in Verbindung mit der Expression sogenannter „*survival genes*“ ist für die Entscheidung „Eintritt der Zelle in die S-Phase des Zellzyklus versus Zelltod durch Apoptose“ von großer Bedeutung (BISHOP, 1982; MARCU et al., 1992). Eine Dysregulation des *c-myc* wird mit diversen Tumorerkrankungen in Verbindung gebracht (BISHOP, 1982). Insbesondere Retroviren wie das Aviäre Leukosevirus nutzen die regulatorischen Funktionen des *c-myc* für ihre Replikation, indem sie virale Gensequenzen in der Nähe des *c-myc*-Gens integrieren und seine Expression um ein Vielfaches steigern (HAYWARD et al., 1981; PAYNE et al., 1982; NOTTENBURG et al., 1987; HIHARA et al., 1998).

Die Beeinflussung der Wirkung des Kernenzym **p53** ist ein häufiges Ziel insbesondere von Tumoviren. Das p53 erfüllt in der Zelle eine Vielzahl von Funktionen. Neben der DNA-Reparatur und dem Zellzyklusarrest wird es auch für die Reaktionsabläufe während der Apoptose benötigt (FINLAY et al., 1989; LEVINE et al., 1991; LANE, 1992; ROEMER und FRIEDMANN, 1994). Durch seine Funktion als Transkriptionsfaktor greift p53 in die Apoptosekaskade ein, indem es u.a. die Expression des proapoptotischen Bax positiv, die Expression des antiapoptotischen Bcl-2 hingegen negativ reguliert (MIYASHITA et al., 1994; MIYASHITA und REED, 1995; FINDLEY et al., 1997; WANG et al., 1998; CHAN et al., 2000; WU et al., 2001). Etwa 50 % aller malignen Tumoren exprimieren ein mutiertes p53, während die restlichen 50 % gestörte Signalkaskaden von oder zu p53 aufweisen (KO und PRIVES, 1996). Eine Vielzahl von DNA-Viren können nur in Zellen mit defektem p53 replizieren und verfügen dementsprechend wie das Epstein-Barr-Virus (EBV) oder Adenoviren über Strategien, um das p53 zu deaktivieren (KO und PRIVES, 1996; NEIL et al., 1997; DEVIREDDY und JONES, 1999; MURAKAMI, 2001).

Das Retinoblastom-Gen **rb** ist der Prototyp der Tumorsuppressorgene. Sein Genprodukt, das Phosphoprotein pRb, fungiert als Kontrollpunkt während des Zellzyklus, indem es die Fortsetzung der G<sub>1</sub>-Phase unterbindet (WIMAN, 1993; HARBOUR et al., 2000). Das pRb komplexiert mit diversen Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie, die für den Ablauf des Zellzyklus benötigt werden, und inhibiert dadurch die Transkription weiterer notwendiger Gene wie z.B. der Thymidinkinase oder DNA-Polymerase (NEVINS, 1992; NEVINS, 2001). pRb kann über bisher noch nicht vollständig geklärte Mechanismen Apoptose sowohl induzieren als auch inhibieren. Einige Caspasen sind zudem in der Lage, das pRb zu spalten und damit zu inaktivieren, was im Zelltod durch Apoptose resultiert (DEPRAETERE und GOLSTEIN, 1998). Einige DNA-Viren kodieren für Genprodukte, die als Inhibitoren des pRb wirken. Sie binden an das Protein und initiieren dadurch die Freisetzung der Transkriptionsfaktoren E2F, was die Fortsetzung des Zellzyklus zur Folge hat. Hierzu zählen u.a. das SV40 large T antigen (BARRY und MCFADDEN, 1998) und das E1A der Adenoviren (CRESS und NEVINS, 1996).

Viele Viren beeinflussen die zelluläre Abwehr durch die Kontrolle der Apoptoseinduktion über den *extrinsic pathway*. Adenoviren kodieren für Genprodukte (E3-10.4K und E3-14.5K), die einen direkten Einfluss auf die **Fas**-Präsentation an der Plasmamembran der infizierten Zelle nehmen. Die Reduktion des Rezeptors führt zu einer Resistenz gegenüber Fas-induzierter Apoptose (BRAITHWAITE und RUSSELL, 2001). Das M-T2-Protein des Myxomavirus ähnelt strukturell dem **TNFR** und bindet aktiv den Liganden TNF, inhibiert jedoch an dieser Stelle die Signalkaskade (SCHREIBER et al., 1996; SCHREIBER et al., 1997).

Die Doppelstrang-RNA-abhängige Proteinkinase (ds PKR) ist ein Mediator für die antivirale Wirkung des Interferons. Sie wird exprimiert, wenn Zellen einer erhöhten Konzentration dieses Cytokins ausgesetzt sind. Die PKR bindet dsRNA, welche als

Intermediat während der Replikation von RNA-Viren auftritt. Zudem wird das eigentliche Substrat, der Translationsinitiationsfaktor eIF-2 $\alpha$  inhibiert (JACOBS und LANGLAND, 1996). Dies führt sowohl zum Arrest der zellulären als auch der viralen Translation. Die Aktivität der PKR wird auch mit der Apoptoseinduktion über den „*extrinsic pathway*“ in Verbindung gebracht (BALACHANDRAN et al., 1998). Auch das Vacciniavirus verfügt mit dem E3L über ein Genprodukt, welches die ds PKR-Aktivität inhibiert (CHANG et al., 1992).

Ein wichtiger Bestandteil der Antwort eines Säugetierorganismus auf eine Infektion ist das **Interferon** (IFN). IFN beeinflusst die Expression wichtiger Gene, hier u.a. die ds PKR. Es ist sehr wahrscheinlich, dass IFN die virale Replikation in jedem Stadium der Infektion beeinträchtigen kann (STARK et al., 1998). Um so verwunderlicher ist daher, dass bisher nur sehr wenig über eine virale Manipulation der IFN-Signalwege bekannt ist. Es scheint jedoch neben der Wirkung auf durch IFN induzierbare Gene auch eine auf die Effektormoleküle der IFN-Kaskade zu geben (KRAJCSI und WOLD, 1998; MCFADDEN et al., 1998).

Der *nuclear factor  $\kappa$ B* (**NF $\kappa$ B**) kommt im Cytoplasma bzw. im Zellkern vieler Zellarten vor, liegt dort jedoch meist in seiner inaktiven Form, gebunden an seinen Inhibitor I- $\kappa$ B, vor, wird durch unterschiedliche äußere Mechanismen wie z.B. Interleukin-1, Schädigung der DNA oder den Anstieg von zellulären Sauerstoffradikalen, aktiviert und vom Cytoplasma in den Kern translociert, wo er als Transkriptionsfaktor die Expression u.a. von Interferon  $\beta$  und Interleukin-2 ankurbelt (KNIPPERS, 1995). Auch Viren wie HIV sind in der Lage, NF $\kappa$ B zu aktivieren (AYYAVOO et al., 1997). Das Coreprotein des HCV inhibiert hingegen NF $\kappa$ B in einigen Zellen und ist in der Lage, Apoptose zu induzieren (MARUSAWA et al., 1999).

Auch die **Caspasen** sind als Schlüsselenzyme der Apoptosekaskade wichtige Angriffspunkte. Sowohl Vertreter der DNA- als auch der RNA- und Insektenviren verfügen über Strategien, um die Caspasenkaskade für ihre Zwecke zu manipulieren. Das HBx-Protein des Hepatitis-B-Virus (HBV) scheint in der akuten und in der latenten Phase der Infektion eine Rolle zu spielen, indem es die Balance zwischen Proliferation und Zelltod reguliert. Es wirkt sowohl pro- als auch antiapoptotisch und zeigte sich als potenter Caspase-3-Inhibitor (GOTTLOB et al., 1998; MURAKAMI, 2001). Die Beeinflussung der Caspase-8 ist das Ziel mehrerer Viren. Während der Transaktivator Tat des HIV Typ I die Expression steigert, inhibieren das CrmA-Protein des Kuhpockenvirus und das p35-Protein des Baculovirus die Caspase-8-Aktivität und damit die rezeptorvermittelte Apoptose (BUMP et al., 1993; TEWARI und DIXIT, 1995).

Die regulatorische Wirkung der Proteine der **Bcl-2-Familie** kann auf zwei verschiedene Weisen erfolgen. Zum einen über die Expression viraler Genprodukte (vBcl-2-Proteine) mit homologer Funktion, zum anderen über die Wirkung auf die Expression der Proteine selbst. Die bisher identifizierten vBcl-2-Proteine agieren als Apoptoseinhibitoren. Sie verfügen meist über sämtliche BH-Domänen und ähneln dadurch dem Prototypen der Familie (CUCONATI und WHITE, 2002). Ein Vertreter der vBcl-2 ist

das E1B-19K der Adenoviren. Es ist durch Interaktion mit den proapoptischen Proteinen Bak, Bik und Bax in der Lage, Apoptose zu inhibieren (SUNDARARAJAN et al., 2001). Das HIV-1-Tat-Protein wirkt positiv auf die zelluläre Bcl-2-Expression in lymphoiden, epitheloiden und neuronalen Zellen und verhindert dadurch die Apoptose-induktion (ZAULI et al., 1993). Die hier zugrundeliegenden Mechanismen sind jedoch noch weitestgehend ungeklärt.

Tabelle 2-2 gibt einen zusammenfassenden Überblick über die oben aufgeführten Viren und die ihnen zur Verfügung stehenden Strategien zur Manipulation zellulärer Abwehrmechanismen.

<b>Virus</b>	<b>Protein</b>	<b>Mechanismus</b>
Adenovirus	E1A	Regulation des p53
	E1B-19K	Bcl-2-Homolog
	E3-10.4K E3-14.5K	Inhibition der Fas-Antwort
	E1A	pRb-Inhibition
Aviäres Leukose- Virus	?	<i>c-myc</i> -Beeinflussung
Baculovirus	p35	Caspase-8-Inhibitor
HBV	?	NFκB-Induktion
	HBx	Caspase-3-Inhibitor
HCV	Core	NFκB-Inhibition
HIV-1	Tat	Bcl-2-Expression
	Tat	Verstärkung der Caspase-8-Aktivität
	Vpr?	NFκB-Induktion
Myxomavirus	M-T2	Inhibition der TNFR-Antwort
SV 40	Large T	pRb-Inhibition
Vacciniavirus	E3L	ds PKR-Inhibitor

**Tabelle 2-2:** Zusammenfassung einiger viraler Strategien zur Manipulation der zellulären Abwehr.

### 2.3 BVD-Virusinfektionen und Apoptose

1996 konnte gezeigt werden, dass der cp Biotyp des BVD-Virus im Gegensatz zum ncp Biotyp in Zellkulturen Apoptose induziert (ZHANG et al., 1996). Die Zellen wiesen charakteristische Merkmale wie die Kondensation und Fragmentierung der DNA auf. Auch die Spaltung des Kernenzym Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) konnte später nachgewiesen werden (HOFF und DONIS, 1997). Versuche zur Infektion von

peripheren mononucleären Zellen des Blutes (PBMC) bestätigten die vorangegangenen Ansätze und ließen eine Schlüsselrolle der Monocyten vermuten (LAMBOT et al., 1998). Die Ergebnisse der *in vitro*-Studien konnten nach der Untersuchung von persistent infizierten Tieren, bei denen das Krankheitsbild der MD experimentell induziert wurde, auf eine Infektion *in vivo* übertragen werden (TEICHMANN et al., 2000).

Weitere Untersuchungen der Apoptoseinduktion auf zellulärer Ebene führten zur Entdeckung eines bisher unbekanntes Charakteristikums. Die Infektion mit dem cp BVD-Virus führte zu einem Anstieg von intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und dem damit verbundenen Auftreten von oxidativem Stress. Erste Anzeichen konnten bereits in einem frühen Stadium der Infektion nachgewiesen werden. Die Zugabe einiger Antioxidantien inhibierte die Apoptosekaskade, ohne die Virusreplikation einzuschränken (SCHWEIZER und PETERHANS, 1999). Vergleichende Untersuchungen eines „matching pairs“ basierend auf dem cytopathogenen Laborstamm NADL zeigten ein weiteres Phänomen auf: Die Infektion mit dem cp BVD-Virus führte im Vergleich zur Infektion mit ncp BVD-Virus zu einer signifikant erhöhten Akkumulation viraler RNA. Demgegenüber unterschieden sich weder Proteinexpression noch Wachstumsverhalten (VASSILEV und DONIS, 2000). Studien, die sich mit der Interferon-Synthese im Verlauf der BVD-Virusinfektion beschäftigten, gaben den ersten Hinweis auf eine aktive Apoptoseinhibition durch den ncp Biotyp. In Zellen, die mit ncp BVD-Virus infiziert waren, unterblieb die Apoptoseinduktion nach Zugabe von dsRNA, welche ebenfalls ein Intermediat im Verlauf der Virusreplikation darstellt. Auch die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Interferon-Synthese wurde inhibiert (SCHWEIZER und PETERHANS, 2001).

Die Frage nach dem für die Manipulation der zellulären Abwehrmechanismen verantwortlichen viralen Protein konnte noch nicht umfassend geklärt werden. Das Auftreten von cp BVD-Viren korrelierte bisher stets mit Änderungen der Genomstruktur im Bereich des NS2-3-Gens, welche die Prozessierung des NS2-3-Proteins in die Proteine NS2 und NS3 zur Folge hat (MEYERS et al., 1989; MEYERS et al., 1991a; QI et al., 1992; GREISER-WILKE et al., 1993). Doch auch andere Proteine scheinen Einfluss auf die Initiation bzw. die Inhibition der Apoptose infolge einer Infektion mit dem BVD-Virus nehmen zu können. Zwei mögliche Kandidaten sind das Capsidprotein C und das Glykoprotein E<sup>ms</sup>.

Das E<sup>ms</sup> ist ein für Pestiviren charakteristisches Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 48 kDa und wird von infizierten Zellen in den extrazellulären Raum sezerniert (RUMENAPF et al., 1993; WINDISCH et al., 1996). Weder Vertreter des Genus Flavivirus noch das HCV codieren für ein vergleichbares Protein. Seine Funktion während der Virusreplikation ist bisher unklar. Es scheint jedoch sowohl für die Adsorption als auch für die Virusreplikation benötigt zu werden (WINDISCH et al., 1996). Da dem E<sup>ms</sup> eine Transmembrandomäne fehlt, ist seine Verbindung mit der Virushülle bisher ungeklärt. E<sup>ms</sup> verfügt über eine RNase-Aktivität, welche auf zwei kurzen Regionen des Proteins lokalisiert ist. Eine Inaktivierung führt zur Entstehung

von cytopathogenem CSF-Virus, weshalb hier ein Zusammenhang zwischen Viruspersistenz und RNase-Aktivität vermutet wird (HULST et al., 1998). Versuche mit aufgereinigtem E<sup>ms</sup> zeigten, dass dieses Glykoprotein in Lymphocyten diverser Spezies die Proteinbiosynthese inhibiert und Apoptose induziert. Allerdings induzierte aufgereinigtes E<sup>ms</sup> in epitheloiden Zelllinien keine Apoptose (BRUSCHKE et al., 1997).

Das Nucleocapsidprotein C ist mit einem Molekulargewicht von 14 kDa relativ klein und enthält viele basische Aminosäuren. Neben seiner Funktion als Schutz des viralen Genoms vermutet man weitere potentielle Eigenschaften des C-Proteins. Untersuchungen des C-Proteins des HCV zeigten, dass es als Transkriptionsregulator fungieren, und damit die Wirkung diverser Promotoren beeinflussen kann (RAY et al., 1997). Auch für das C-Protein des CSF-Virus wurden transkriptionsregulatorische Funktionen beschrieben (LIU et al., 1998a). Genaue Mechanismen sind allerdings unbekannt. Auch die Existenz einer Signalsequenz für den Transport in den Zellkern konnte bisher nicht mit einer genauen Funktion in Verbindung gebracht werden (LIU et al., 1998b).





## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Zelllinien

Für die Durchführung der Versuche standen insgesamt fünf Zelllinien verschiedener Spezies zur Verfügung (Tabelle 3-1):

Zelllinie	Spezies	Ursprung	Zelltyp	ATCC-Nr.
FKN	Rind	fetale Niere	primär fibroblastoid	/
MDBK	Rind	fetale Niere	permanent epitheloid	CCL-22
HeLa	Mensch	Cervix	permanent epitheloid	CRL-7396
PT	Rind	Niere, Kalb	permanent epitheloid	RIE 11
cos-7	Grüne Meerkatze	Niere	permanent fibroblastoid	CRL-1651
PT-E <sup>rms</sup>	Rind	Niere, Kalb	permanent epitheloid	/
PT-B2	Rind	Niere, Kalb	permanent epitheloid	/

**Tabelle 3-1:** In dieser Arbeit verwendete Zellen.

#### Fetale Kälbernieren- Zellen (FKN-Zellen)

Die Primärkultur aus fetalen Kälbernieren wurde am Institut für Virologie der Tierärztlichen Hochschule (TiHo) Hannover nach der Standardmethode hergestellt (FREY und LIESS, 1971). FKN-Zellen wachsen vorwiegend mit fibroblastoider Morphologie und sind für das BVD-Virus permissiv. Im Rahmen dieser Arbeit wurden

sie für die Virusvermehrung, den Nachweis der Enzymaktivitäten in BVD-virusinfizierten Zellen und für proteinbiochemische Untersuchungen im Verlauf der BVD-Virusinfektion verwendet.

#### **MDBK-Zellen (Madin-Darby-Bovine-Kidney-Zellen; ATCC-Nr. CCL-22)**

Die permanente Epithelzelllinie wurde aus einer fetalen Kälberniere etabliert. Sie ist ebenfalls für das BVD-Virus permissiv und wurde für die Expression des E<sup>rns</sup> verwendet.

#### **HeLa-Zellen (ATCC-Nr. CRL-7396)**

Die permanente humane Epithelzelllinie wurde aus einem Cervixkarzinom einer Patientin (Henrietta Lang) etabliert. Sie diente als positive Kontrolle sowohl der Untersuchungen zur Kreuzreaktivität der verwendeten Antikörper als auch in den Untersuchungen zur Caspasenaktivität.

#### **PT-Zellen (RIE 11)**

Die permanente bovine Zelllinie zeigt eine epitheloide Morphologie und stammt aus einer Kälberniere. Sie ist für das BVD-Virus permissiv und wurde sowohl für die transiente Proteinexpression als auch für die Etablierung einer stabilen Zelllinie ausgewählt.

#### **cos7-Zellen (ATCC-Nr. CRL-1651)**

Die permanente Epithelzelllinie wurde aus der Niere der Grünen Meerkatze etabliert und wurde aufgrund der Eigenschaft, Fremdproteine gut zu exprimieren, als Kontrolle für die Transfektionsversuche herangezogen.

### **3.1.2 Virusstämme**

Für die Versuche wurden fünf BVD-Virusstämme gewählt. Als rein nicht-cytopathogener Stamm fand 7443 Anwendung, während die Versuche mit cytopathogenem BVD-Virus mit einem Virusklon des cp-Stammes NADL durchgeführt wurden. Für den Sequenzvergleich des E<sup>rns</sup> wurden zusätzlich das BVD-Virusisolat 104/98 vom Typ BVD-Virus 2, und das *matching pair* 5569, bestehend aus ncp 5569 und cp 5569, ausgewählt.

Außerdem wurde der BHV-1-Laborstamm „Colorado“ für die Versuche zur Expression des Bcl-2-Proteins herangezogen.

### 3.1.3 Bakterien

Die Vermehrung von Plasmid-DNA erfolgte im *E.coli*-Stamm XL1-blue (Institut für Virologie, TiHo Hannover).

### 3.1.4 Antikörper

Für den Nachweis von BVD-Virusantigen in der Direkten Immunfärbung (DIF), die Untersuchungen zur Expression der Mitglieder der Bcl-2-Familie Bax und Bcl-2 im Western Blot (WB) und zur Proteinquantifizierung standen die in Tabelle 3-2 aufgeführten Primärantikörper zur Verfügung. Das E<sup>ms</sup> wurde in der Immunfluoreszenz (IF) und im Peroxidase-linked Assay (PLA) mit monoklonalen Antikörpern nachgewiesen.

Bezeichnung	Spezifität / Epitop	Herkunft / Isotyp	Bezugsquelle	Konzentration DIF / WB	Nutzung
α BVD-Virus-PO	div. Proteine des BVD-Virus	pAk Schwein	Inst. f. Virol. TiHo Hann.	1 : 200	DIF
α Bcl-2	div. Epitope	pAk Kaninchen	Santa Cruz 50-492	1 : 500 1 : 1500	IF, PLA WB
α Bax	AS 43 - 61	pAk Kaninchen	Santa Cruz	1 : 1500	WB
α Cyt c	Cyt c div. Spezies	pAk Kaninchen	Oncogene	1 : 500	WB
α p53		pAk Schaf	Roche	1 : 500	WB
α Apaf-1	humanes Apaf-1 AS 12 – 28	pAk Kaninchen	Pharmingen	1 : 1000	WB
C12, C38, C42	E <sup>ms</sup> des BVD-Virus	mAk Maus	Inst. f. Virol. TiHo Hann.	1 : 200	IF, PLA
α Calreticulin	Kaninchen	pAk Ziege	Serotec	1 : 100	IF
α Cytokeratin	?	mAk Maus	DAKO	1 : 100	PLA
α Actin		pAk Ziege	Santa Cruz	1 : 1000	WB

**Tabelle 3-2:** In dieser Arbeit verwendete Primärantikörper.

Die Sekundärantikörper waren Peroxidase- bzw. FITC-gekoppelt und sind in der Tabelle 3-3 aufgeführt.

Bezeichnung	Spezifität / Epitop	Herkunft	Bezugsquelle	Konz.	Nutzung
GAMPO	Maus-IgG-Peroxidase	pAk Ziege	Inst. f. Virol. TiHo Hann.	1 : 1000	WB
PARPO	Kaninchen-IgG-Peroxidase	pAk Schwein	DAKO P0217	1 : 2000	WB
RAGPO	Ziege-IgG-Peroxidase	pAk Kaninchen	Sigma	1 : 2000	WB
PAR-FITC	Kaninchen-IgG-FITC	pAk Schwein	Amersham	1 : 200	IF
DAR-TR	Kaninchen-IgG TexasRed	pAk Esel	Amersham	1 : 200	IF
GAM-FITC	Ziege-IgG-FITC	mAk Maus	Inst. f. Virol. TiHo Hann.	1 : 100	IF

**Tabelle 3-3:** In der Arbeit verwendete Sekundärantikörper.

### 3.1.5 Substrate und Inhibitoren für den Nachweis der Caspasenaktivität

Die Untersuchung der Aktivierung von Mitgliedern der Caspasenfamilie wurde mit Hilfe der in Tabelle 3-4 aufgeführten chromogenen Substrate und Inhibitoren durchgeführt.

Substrat / Inhibitor	Herkunft	Spezifität
Ac-DEVD-pNA	biomol	Caspase-3
Ac-LEHD-pNA	biomol	Caspase-9
FITC-VAD-FMK	Promega	Alle Caspasen
Z-VAD-FMK	biomol	Alle Caspasen

**Tabelle 3-4:** Substrate und Inhibitoren für die Untersuchung der Caspasenaktivität.

### 3.1.6 Vektoren

Für die Expression des E<sup>ms</sup> und des Bcl-2 standen die folgenden Plasmidvektoren zur Verfügung:

**pcDNA 3.1. / Zeo (+)** (Invitrogen) wurde für die Expression des E<sup>ms</sup> eingesetzt. Das Vektorsystem bietet den Vorteil einer stabilen, konstitutiven „high level“ Expression in diversen Säugerzellen.

**pUSEamp** (biomol) wurde als Kontrollplasmid für die Expression des murinen Bcl-2-Proteins verwendet.

**pUSEamp bcl-2** (biomol) exprimiert das murine Bcl-2-Protein = pB2.

**pSeqTag 2B** (Invitrogen) sollte die durch die Fusion mit der Igκ-Leadersequenz die Sezernierung des rekombinanten E<sup>ms</sup> in den Zellkulturüberstand gewährleisten.

**PEGFP-N1** (Clontech) exprimiert das „green fluorescent protein“ (GFP) und wurde als Kontrollvektor für die Prüfung der Transfektionseffizienz mit herangezogen.

### 3.1.7 Sonstige Materialien

Die Zusammensetzung der Medien, Puffer und Lösungen sowie die verwendeten Chemikalien, Enzyme und kommerziell erhältlichen Testsysteme werden im Anhang gesondert aufgeführt.

Die in der PCR und für die Plasmidsequenzierung verwendeten Primer sind ebenfalls im Anhang zusammengefasst.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Anzucht und Passage von Zellkulturen

Alle Zellkulturen wurden im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>-Partialdruck und 95 % gesättigter Wasserdampfatosphäre kultiviert. Dem Medium wurde, wenn nicht gesondert erwähnt, eine Antibiotikallösung aus Penicillin (Endkonz. 50 mg / l) und Streptomycin (Endkonz. 60 mg / l) zugesetzt. Sie wurden kulturell und mittels PCR auf eine eventuelle Infektion mit BVD-Virus hin untersucht und erwiesen sich als BVD-Virus-negativ. Die Zellen wurden in einer Thoma-Kammer [neu] gezählt und mit Nährmedium auf die jeweils benötigte Zellzahl eingestellt.

FKN-Zellen wurden in Dulbeccos Modifikation von „*Eagle's Minimal Essential Medium*“ (EMEM) DMEM + 5 % Fetalem Kälberserum (FKS) bzw. 5 % BVD-Virus-freiem Rinderserum (RS) bei Infektion mit BVD-Virus kultiviert. Sie wurden alle drei

bis vier Tage in einem Verhältnis 1 : 8 bis 1 : 10 passagiert. Für die Versuche wurden Zellen der dritten bis fünften Passage eingesetzt.

Die Kultivierung der PT-Zellen erfolgte in EMEM + 10 % Fetalem Kälberserum (FKS). Eine Passage wurde alle drei bis vier Tage im Verhältnis 1 : 8 bis 1 : 10 durchgeführt.

PT/B2-Zellen wurden in EMEM + 10 % FKS zuzüglich Zeocin (0,5 mg / ml) kultiviert und alle drei bis vier Tage 1 : 5 passagiert.

HeLa-Zellen wurden in DMEM + 10 % FKS kultiviert und alle drei bis vier Tage 1 : 10 bis 1 : 20 passagiert.

### 3.2.2 Herstellung elektrokompetenter *E.coli* XL1 blue

Für die Herstellung von elektrokompetenten *E.coli* XL1 blue wurde zunächst eine 25 ml-Übernachtskultur (ÜNK) in Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) bei 37 °C und 180 rpm herangezogen. 10 ml der ÜNK wurden für das Animpfen der Hauptkultur (Volumen 1000 ml) verwendet. Diese wurde bis zu einer  $OD_{600} = 0,8$  bis 1,0 inkubiert. Die Bakterien wurden 15 min bei 4 °C und 3000 x g pelletiert und anschließend in 1000 ml eiskaltem Aqua bidest resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (s.o.) wurde das Bakterienpellet in 500 ml eiskaltem Aqua bidest gewaschen und unter denselben Bedingungen pelletiert. Das Pellet wurde anschließend in 20 ml einer sterilen 10 %-igen Glycerin-Lösung resuspendiert und im letzten Schritt zentrifugiert. Abschließend wurden die Bakterien in 3 ml 1 %-igem Glycerin resuspendiert, in 50 µl portioniert in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur Elektroporation gelagert.

### 3.2.3 Virusvermehrung und -ernte

Für die Virusvermehrung wurden FKN-Zellen der dritten bis fünften Passage in 750 ml-Zellkulturflaschen bis zu einer 50 – 60 %igen Konfluenz kultiviert. Vor der Infektion wurde das Medium entfernt, und der Zellrasen mit PBS gewaschen. Danach wurden 2 ml einer Virussuspension mit einer Kulturinfektiosen Dosis 50 ( $KID_{50}$ ) von  $10^{6,5}$  für 1 h auf den Zellrasen gegeben und bei 37 °C inkubiert, wobei die Flaschen geschwenkt wurden, um eine gleichmäßige Infektion zu erreichen. Nicht adsorbierte Viren wurden durch Abpipettieren des Überstandes nach 1 h entfernt. Nach der Adsorptionsphase wurde frisches rinderserumhaltiges Medium hinzugefügt.

Je nach Virusisolat betrug die Inkubationsdauer:

cp BVD-Virus	ca. 48 h
ncp BVD-Virus	ca. 72 h.

Zur Ernte des BVD-virushaltigen Zellkulturüberstandes wurde das Medium bis auf 8 ml zunächst in ein Zentrifugenglas überführt und bei 4 °C gelagert. Die gesamte Flasche wurde für 5 min bei -80 °C schockgefroren und danach sofort wieder aufgetaut. Die verbliebenen 8 ml wurden mit dem restlichen Überstand vereinigt und für 20 min bei

1500 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde portioniert und bei -80 °C gelagert. Zur Bestimmung des Titters wurden eine Virustitration und Direkte Immunfärbung (DIF) angeschlossen.

### 3.2.4 Virustitration

#### Prinzip

Die Virustitration diente der Bestimmung der statistischen Anzahl infektiöser Viruspartikel im Kulturüberstand infizierter Zellen. Durch Erstellung einer gleichmäßig abgestuften Verdünnungsreihe und der Infektion einer definierten Zellzahl mit den einzelnen Verdünnungsstufen, konnte diejenige Verdünnung einer Virussuspension ermittelt werden, in der noch eine infektiöse Einheit vorlag (Endpunktverdünnung). Über diese Endpunktverdünnungsmethode wurde die  $KID_{50}$  der unverdünnten Virussuspension anhand der Gleichung 3.1 berechnet (KAERBER, 1931).

$$\log KID_{50} = \log_{1,0} - \log_{\text{int}} (S - 0,5)$$

**Gleichung 3.1:** Kalkulation der  $KID_{50}$  nach KAERBER.

$\log KID_{50}$ :	Logarithmus der Kulturinfektiösen Dosis 50
$\log_{1,0}$ :	Logarithmus der höchsten Virusverdünnungsstufe mit der Reaktionsrate $r = 1,0$
$\log_{\text{int}}$ :	Logarithmus des Verdünnungsintervalls
S:	Summe der Reaktionsraten R
0,5:	Konstanter Wert

#### Durchführung

FKN-Zellen der vierten oder fünften Passage wurden mit einer Aussaatdichte von ca.  $1,2 \cdot 10^4$  Zellen pro Mikrotiterplatten-Kavität in 100 µl Medium für einen Tag vorinkubiert. Von der zu titrierenden Suspension wurde eine  $\log_{10}$ -Verdünnungsreihe von  $10^{-2}$  bis  $10^{-8}$  erstellt. Pro Verdünnungsstufe wurden vier Parallelansätze durchgeführt. Die Inkubation der Mikrotiterplatten erfolgte für 48 h bei 37 °C und 3,5 %  $\text{CO}_2$ . Nach der Inkubation wurden die Zellen mit verdünnter Phosphat-gepufferter Saline (1/3 PBS) gewaschen und bei 80 °C für 4 h im Brutschrank fixiert. Virusantigen wurde mit Hilfe der direkten Immunfärbung (DIF) nachgewiesen.

### 3.2.5 Direkte Immunfärbung

#### Prinzip

Der Nachweis der Infektion der Zellkultur mit BVD-Virus erfolgte über den Einsatz gegen das BVD-Virus gerichteter Antikörper porcinen Ursprungs. Sie waren mit dem Enzym Peroxidase konjugiert und detektierten die BVD-viruspezifischen Glykoproteine. Die Peroxidase reduziert ihr Substrat  $\text{H}_2\text{O}_2$  bei gleichzeitiger Oxidation des

3'-Amino-9'-Ethylcarbazols (AEC). Findet eine Antigen-Antikörper-Reaktion statt, so setzt das Enzym sein Substrat um, was durch eine Antigenfärbung im Cytoplasma, dem Replikationsort des Virus, sichtbar wird.

### **Durchführung**

Die fixierten Zellen in den Vertiefungen der Mikrotiterplatten wurden zunächst mit 1/3 PBS gewaschen und auf Zellstoff ausgeklopft. Pro Kavität wurden 5 µl des verdünnten polyklonalen Serums eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 37 °C. Nach dreimaligem Waschen des Zellrasens mit 1/3 PBS wurden ebenfalls 50 µl der AEC-Reaktionslösung hinzupipettiert und für maximal 10 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Reaktion wurde mit Aqua bidest beendet. Die Platten wurden unter dem Lichtmikroskop ausgewertet.

## **3.2.6 Virusklonierung**

### **Prinzip**

Ziel der biologischen Virusklonierung war es, Nachkommen eines einzelnen cp BVD-Viruspartikels aus einer Mischkultur zu erhalten. Die Überschichtung eines infizierten Zellrasens mit Nähragar gewährleistet, dass die Infektion nur radial von Zelle zu Zelle erfolgen kann. Durch die Wahl geeigneter Verdünnungsstufen der Virussuspension konnte jede infektiöse Einheit der Suspension einem Plaque im Zellrasen zugeordnet werden (LIESS et al., 1993).

### **Durchführung**

Sechs ml einer auf ca.  $2,2 \times 10^5$  Zellen / ml eingestellten Zellsuspension wurden gleichmäßig in Gewebekulturschalen eingesät und für ein bis zwei Tage bei 37 °C inkubiert. Vor der Infektion wurde das Medium dekantiert, und der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen.

Die Infektion der Zellen erfolgte mit 0,8 ml einer Virussuspension für 1 h bei 37 °C. Pro Virusisolat wurden drei Verdünnungsstufen in jeweils zwei Parallelansätzen erstellt (Verdünnungsstufen:  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ). Die Schalen wurden alle 20 min geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung des Virus zu erzielen. Nach der Adsorptionsphase wurde die restliche Virussuspension abgenommen, und der Zellrasen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die Kultur mit 8 ml Nähragar überschichtet und für ca. sechs Tage bei 37 °C inkubiert.

Um die durch das cp BVD-Virus verursachten Plaques besser kenntlich zu machen, wurde der Nähragar mit 5 ml eines Neutralrot-haltigen Agars überschichtet und für 2 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Zellen, die infolge des cytopathischen Effektes (CPE) des Virus zerstört worden waren, wurden nicht angefärbt und waren als helle Plaques im Gegenlicht sichtbar.

Mit Hilfe einer in PBS angefeuchteten Pasteurpipette wurde aus einem Plaque ein Agarzylinder ausgestanzt, der auch infektiöses Virus enthalten musste. Dieser wurde in



eine im Gewebekulturröhrchen wachsende Zellkultur überführt ( $1,5 \times 10^5$  FKN-Zellen in 1,5 ml Medium), welche ein bis zwei Tage im Schrägständler bei 37 °C vorinkubiert wurde. Nach einer vier- bis sechstägigen Inkubationszeit auf einer Rollvorrichtung bei 37 °C, bzw. nach 60 %-iger Zerstörung des Zellrasens, wurde das Kulturröhrchen bei -80 °C tiefgefroren und später als Inokulum für eine Virusvermehrung genutzt. Die Überprüfung etwaiger Kontaminationen durch ncp BVD-Virus erfolgte über einen Immunoplaquetest.

### 3.2.7 Immunoplaquetest

#### Prinzip

Mit Hilfe des Immunoplaquetests konnte zwischen den beiden Biotypen des BVD-Virus unterschieden und auf diese Weise die Reinheit der isolierten Virusklone verifiziert werden. Auch hier wurde die Virusausbreitung durch Überschichtung mit Agar auf die direkte Infektion von einer Zelle zu den benachbarten Zellen beschränkt. Mischkulturen aus cp und ncp BVD-Virus führen zu unterschiedlichen Plaqueausbildungen. Während mit ncp BVD-Virus infizierte Zellen die Infektion überlebten und zu einem deutlich ausgefüllten, rot-braunen Plaque im Immunoplaquetest führten, starben mit cp BVD-Virus infizierte Zellen im Verlauf der Infektion ab und setzten neue Viruspartikel frei, die zur Infektion der umgebenden Zellen führten. Die abgestorbenen Zellen lösten sich aus dem Zellverband, so dass diese nicht mehr angefärbt wurden. Dementsprechend entstanden charakteristische ringförmige Plaques (LIESS et al., 1993).

#### Durchführung

Zunächst wurde von der zu testenden Suspension eine Verdünnungsreihe erstellt. Jeweils 800 µl der Verdünnungsstufen wurden in einem Doppelansatz auf FKN-Zellen der vierten bis fünften Passage ( $1,2 \times 10^6$  Zellen / 6 cm Ø-Gewebekulturschale; Vorinkubation für ca. 24 h) gegeben und diese für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Virussuspension abgenommen und der Zellrasen mit 6 ml Nähragar überschichtet. Nach sechs Tagen wurde der Agar entfernt, der Zellrasen gewaschen und für 4 h bei 80 °C hitzefixiert. Die Überprüfung der Reinheit erfolgte über eine DIF.

### 3.2.8 Herstellung von Zelllysaten

Für die Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und die Enzymtests sollten Zelllysate hergestellt werden. Die zu verwendende Methode sollte für den enzymatischen Nachweis einerseits gewährleisten, dass die Proteine in ihrer nativen Form erhalten bleiben und dadurch auch im Lysat enzymatisch aktiv werden können, andererseits sollte die DNA, welche die Proteinauftrennung im SDS-Gel nachhaltig stört, möglichst effizient entfernt werden. Für beide Fragestellungen eignete sich deshalb die Lyse mit *Radio-Immuno-Precipitation-Assay-Puffer* (RIPA-Puffer).

### Durchführung

Für die Herstellung von Zelllysaten für den Enzymtest wurden je nach Fragestellung 2 - 3 x 10<sup>6</sup> Zellen / 12 ml Medium mindestens im Doppelansatz ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach Infektion und anschließender Inkubation wurde das Medium abgenommen, in ein Zentrifugenglas überführt und bei 4 °C gelagert. Der Zellrasen wurde mit kaltem PBS gewaschen, mit Trypsin abgelöst und mit dem Medium vereinigt. Das Zellmaterial wurde für fünf Minuten bei 1000 x g und 4 °C sedimentiert, in kaltem PBS resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurde erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig abgenommen und verworfen. Da für den Enzymtest 2 x 10<sup>6</sup> Zellen / 50 µl eingesetzt wurden, musste die Zellzahl dementsprechend eingestellt werden:

Lysis-Ansatz für 2 x 10<sup>6</sup> Zellen:

50 µl	einfach konzentrierter RIPA-Puffer
2 µg / ml	Aprotinin
0,5 mg / ml	EDTA.

Das Zellsediment wurde in dem benötigten Volumen 1 x RIPA-Puffer und den Protease-Inhibitoren resuspendiert und 30 min bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Abschließend wurde eine Zentrifugation für 10 min bei 12000 x g und 4 °C durchgeführt, um Zelltrümmer zu sedimentieren. Der Überstand enthielt die Proteine und wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung der Proben erfolgte für maximal zwei Wochen bei -80°C. Vor dem Einsatz in den Enzymtests wurde eine Proteinbestimmung der einzelnen Lysate durchgeführt, um jeweils gleiche Proteinmengen einsetzen zu können (siehe 3.2.10).

Die Zellen, die in der SDS-PAGE eingesetzt werden sollten, wurden unter Zugabe des Protease-Inhibitor-Gemischs *Complete*<sup>TM</sup> (Roche) in einem Probenvolumen von 2 x 10<sup>6</sup> Zellen / 50 µl lysiert.

### 3.2.9 Zellfraktionierung

Für die Analyse der Lokalisation von Cytochrom c, Apaf-1 und Bax im Verlauf der BVD-Virusinfektion wurden 10<sup>7</sup> FKN-Zellen in Zellkulturflaschen (162 cm<sup>2</sup> Fläche) ausgesät und mit 2 ml Virussuspension (Titer: KID<sub>50</sub> 10<sup>6,5</sup> / ml) infiziert. Nach 24, 48 und 72 h p.i. wurden adhärenente und bereits abgelöste Zellen vereinigt, zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und für 30 min bei 4 °C in eiskaltem Tris-Puffer (50 mM, pH 7,5) unter Zugabe des Protease-Inhibitor-Gemischs *Complete*<sup>TM</sup> (10 µl / 200 µl Probe) auf dem Schüttler inkubiert. Direkt im Anschluss erfolgte der Zellaufschluss mit dem Potter-Homogenisator. Nuclei und noch intakte Zellen wurden durch einen Zentrifugationsschritt bei 500 x g für 5 min sedimentiert. Die cytosolische Fraktion wurde mittels Ultrazentrifugation (1 h, 4 °C, 100.000 x g) aufgereinigt. Das daraus resultierende Pellet enthielt die Membranfraktion und wurde in mit *Complete*<sup>TM</sup> versetztem

1 x RIPA-Puffer resuspendiert. Vor der Verwendung wurde die Proteinkonzentration bestimmt.

### 3.2.10 Proteinbestimmung

#### Prinzip

Die Bestimmung der Proteinkonzentration für die Enzymtests und SDS-Gelelektrophoresen erfolgte im Mikrotiterplattenmaßstab im Spektralphotometer nach der BCA-Methode (*Bicinchonic Acid*; Pierce). BCA komplexiert in Form des wasserlöslichen Salzes unter alkalischen Bedingungen mit  $\text{Cu}^{2+}$ , was zu einem Farbumschlag führt, der bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 570 \text{ nm}$  messbar ist. Anhand einer Kalibrierungskurve mit Proben definierter Konzentration an BSA konnte der relative Proteingehalt der unbekannt Probe berechnet werden.

#### Durchführung

Zunächst wurde ein Standard aus bovinem Serumalbumin (BSA) in RIPA-Puffer erstellt, der bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert wurde. Pro Reaktionsansatz wurden  $10 \mu\text{l}$  Probe bzw. Standard in Doppelansätzen eingesetzt. Die Proben der Zellysate mussten 1 : 10 bis 1 : 60 verdünnt werden, um in dem durch die Standardkurve definierten Intervall zu bleiben. Die Proben wurden mit je  $200 \mu\text{l}$  der Reaktionslösung versetzt (enthält Natriumcarbonat, Natriumbikarbonat, Natriumtartrat und Kupfersulfat in  $0,2 \text{ N NaOH}$ ) und für 30 min bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Auswertung erfolgte im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 570 \text{ nm}$ .

### 3.2.11 Darstellung der Proteine mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

#### Prinzip

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden zunächst die zellulären Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Proteine wurden danach auf PVDF-Membranen transferiert. Ziel sollte die Darstellung der Expression von Proteinen der bel-2-Familie im Verlauf der BVD-Virusinfektion sein. Die Elektrophoresen wurden unter denaturierenden Bedingungen in Anwesenheit von SDS nach der Standard-Methode durchgeführt (LAEMMLI, 1970).

#### Durchführung

Die Elektrophoresen erfolgten in einer Serva „Mighty Small II SE 250“-Vertikalkammer. Die Gele hatten eine Stärke von  $0,75 \text{ mm}$  und eine Fläche von  $8,5 \times 10 \text{ cm}$ . Für die Auftrennung der Proteine wurden Gele mit einer Acrylamid / Bisacrylamid-Konzentration von  $7,5 - 15 \%$  verwendet.

Das Gel setzte sich aus einem Sammelgel und einem Trenngel zusammen. Das Sammelgel mit einem pH von  $6,8$  diente dazu, die Proteine an der Grenzschicht zum Trenngel zu konzentrieren, um einen gleichmäßigen Gellauf zu gewährleisten. Die

eigentliche Auftrennung der Proteine erfolgte im Trenngel bei einem pH von 8,8. Der Gellauf wurde bei konstantem Stromfluss durchgeführt:

- Stromstärke I = const. 25 mA bis zum Erreichen des Trenngels,
- Stromstärke I = const. 30 mA für die Proteinauftrennung.

Als Standard-Marker wurde der *pre-stained Broad-Range-Marker* Seebblue2 (Invitrogen) eingesetzt. Er deckte ein Größenspektrum zwischen 7,2 kDa und 208 kDa ab.

Die Zellysate wurden für die Auftrennung mit dem gleichen Volumen zweifach-konzentrierten SDS-Probenpuffer versetzt für 5 min bei 100 °C inkubiert und entweder direkt eingesetzt oder bei -80°C gelagert.

### 3.2.12 Western Blot

Die Proteine wurden vom SDS-Gel auf eine PVDF-Membran transferiert. Sie hatte eine Größe von 5 x 8 cm.

Der Blot wurde im „semi dry“-Verfahren durchgeführt. Um die Transferbedingungen zu optimieren, wurden zwei Anodenpuffer eingesetzt, die sich im pH unterschieden. Anodenpuffer I hatte einen pH von 9, während Anodenpuffer II auf einen pH von 6,8 eingestellt wurde.

Der Transfer lief unter folgenden Bedingungen:

- Stromstärke I = const. 0,8 mA pro cm<sup>2</sup> Membran,
- Dauer: 1 h.

Nach dem Blot wurde das Gel zur Kontrolle für 15 min in „Comassie blue“-Lösung gefärbt.

Die Membran wurde über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler in 1 %-Blocking Reagenz (Roche) inkubiert, um die restlichen Proteinbindungsstellen auf der Membran zu blockieren.

### 3.2.13 Immunfärbung

#### Prinzip

Um die Proteinexpression der Bcl-2-Familie nachzuweisen, wurden spezifische polyklonale Antikörper eingesetzt. Die Bindung der Primärantikörper wurde mit einem mit peroxidasekonjugierten Sekundärantikörper detektiert. Die spezifische Bindung der Antikörper wurde durch Umsatz eines für die Peroxidase spezifischen Substrats nachgewiesen.

Hierfür standen die auf der Chemilumineszenz-Technik basierenden Nachweissysteme zur Verfügung. Die Peroxidase-Aktivität führt durch Oxidation eines zyklischen Diacylhydrazids wie Luminol zur Freisetzung von Energie, die auf einen geeigneten

Film übertragen und damit sichtbar gemacht wurde. Für den Nachweis von Proteinen mit geringer Expression konnte durch Verwendung einer reaktionsverstärkenden Substanz im *SuperSignal*-Kit (Pierce) ein deutlicheres Signal erhalten werden.

### Durchführung

Für den spezifischen Nachweis der Proteine wurden die Membranen dreimal für 5 - 10 min in TBS-Tween20 gewaschen. Es folgte die Reaktion mit dem Primärantikörper, der in Blocking-Reagenz verdünnt wurde. Sie wurde 3 h oder über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Nach erneutem dreimaligen Waschen in TBS-Tween20 folgte die Inkubation mit speziesspezifischen anti-IgG-Antikörpern in einer Konzentration von 1 : 100 bis 1 : 1500. Die Inkubation betrug 1 h bei RT. Bevor der Nachweis mittels Chemilumineszenz durchgeführt werden konnte, mussten die Membranen erneut dreimal in TBS-Tween20 gewaschen werden. Proteine mit einer höheren Expressionsrate konnten mit dem *BM Chemiluminescence Blotting Substrate POD*-Kit (Roche) detektiert werden. Hier wurden die Membranen für 1 min bei RT mit der Reaktionslösung benetzt. Anschließend wurde ein Film (Kodak Biomax) belichtet, der die Peroxidase-Aktivität auf der Membran in ein sichtbares Signal umsetzt.

Proteine, die in geringen Mengen exprimiert werden, waren mit Hilfe des *SuperSignal*-Kits (Pierce) nachweisbar. Die Membranen wurden 5 min bei RT mit der Reaktionslösung inkubiert und danach ebenfalls über die Peroxidase-Aktivität nachgewiesen.

### 3.2.14 Analyse des mitochondrialen Transmembranpotentials $\Delta\Psi_m$

Die Untersuchung des  $\Delta\Psi_m$  erfolgte mittels Anwendung des zellpermeablen Farbstoffs DePsipher<sup>TM</sup> (R&D Systems). DePsipher<sup>TM</sup> enthält ein lipophiles Kation (5,5',6,6',7 tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazol carbocyanine iodide), welches als Indikatorsystem für die Aktivität der Mitochondrien genutzt werden kann. Unter physiologischen Bedingungen aggregiert DePsipher<sup>TM</sup> und fluoresziert orange-rot (Absorption / Emission: 585 / 590 nm). Wenn  $\Delta\Psi_m$  zerstört ist, kann es nicht im mitochondrialen Membransystem aggregieren und verbleibt in seiner grün-fluoreszierenden monomeren Form im Cytosol (Absorption / Emission: 510 / 527 nm) (TIDD et al., 2000). Die Veränderungen des  $\Delta\Psi_m$  wurden 12 und 24 h p.i. sowohl im Fluoreszenzmikroskop als auch in der Durchflusszytometrie analysiert. Hierfür wurden FKN-Zellen mit dem cp bzw. ncp Biotyp mit einer MOI = 1 infiziert und nach 12 bzw. 24 h für 20 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> mit 5 µg DePsipher<sup>TM</sup> inkubiert und anschließend mit 0,5 % Paraformaldehyd für 20 min bei RT fixiert. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Farbstoffes erfolgte die Auswertung sofort im Anschluss an die Fixation.

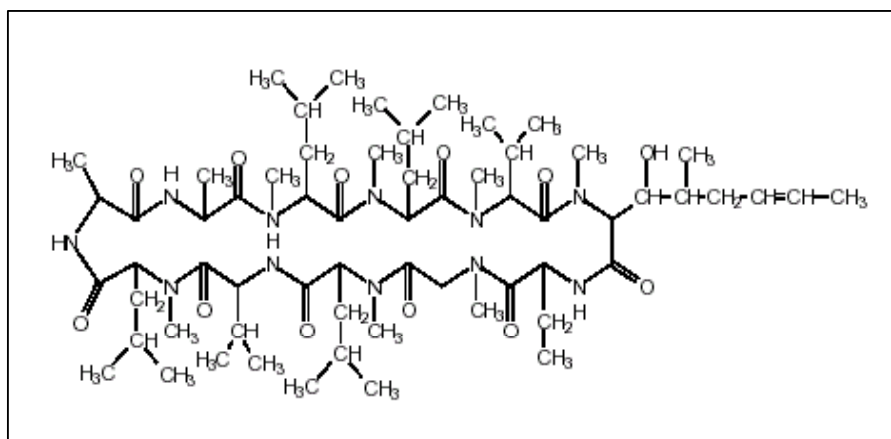
### 3.2.15 Untersuchung der *permeability transition pore*

Die Betrachtung der Ereignisse an der *permeability transition pore* (PTP) im Verlauf der Infektion mit dem cp BVD-Virus wurde mit Hilfe von Inhibitoren, nämlich mit dem

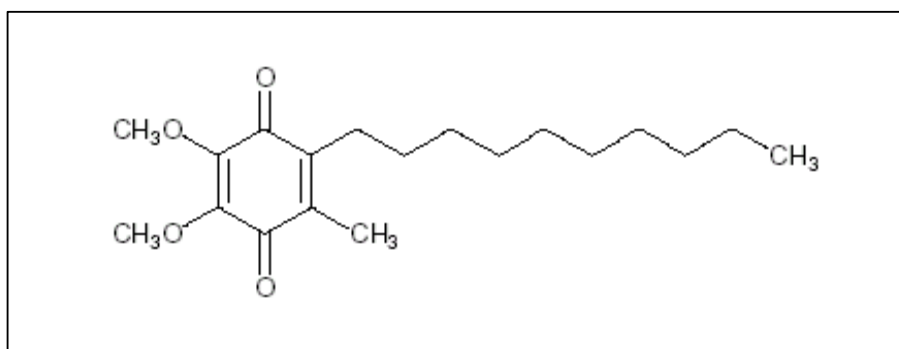
Ubiquinon-Derivat Decylubiquinone (DCU) und dem immunsuppressiv wirkenden Cyclosporin A (Cyclo A) durchgeführt. DCU und Cyclo A inhibieren die PTP-Öffnung in Abhängigkeit von Calcium (FONTAINE et al., 1998). Als Kontrollsubstanz wurde Ubiquinone 5 (Ub<sub>5</sub>) hinzugezogen, welches keinerlei Wirkung auf die PTP ausübt (FONTAINE et al., 1998). Die Strukturformeln der Substanzen sind in Abb. 3-1 bis Abb. 3-3 dargestellt. Hierfür wurden  $8 \times 10^5$  FKN-Zellen auf Deckgläschen in Makrotiterplatten ausgesät und über Nacht inkubiert. Die Zugabe von DCU, Cyclo A bzw. Ub<sub>5</sub> erfolgte simultan zur Infektion mit dem cp BVD-Virus (MOI = 1) in den in Tabelle 3-5 aufgeführten Konzentrationen.

Substanz	Herkunft	Konzentration
Decylubiquinone (DCU)	Biomol	100 $\mu$ M
Cyclosporin A (Cyclo A)	Sigma	1 $\mu$ M
Ubiquinone 5 (Ub <sub>5</sub> )	Sigma	20 $\mu$ M

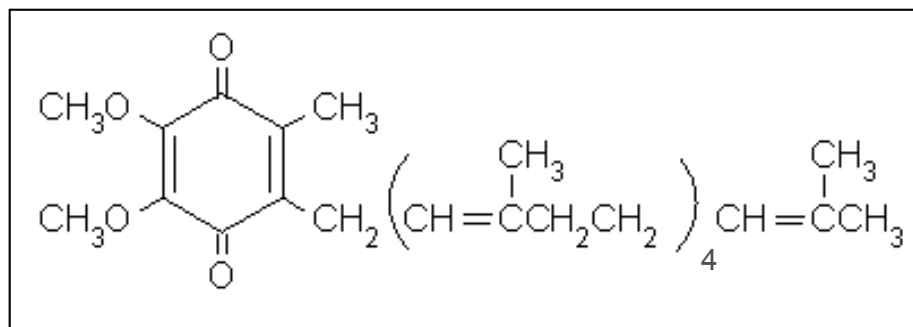
**Tabelle 3-5:** Für die Untersuchung der PTP-Aktivität verwendete inhibitorisch wirksame Substanzen.



**Abb. 3-1:** Strukturformel Cyclosporin A (Cyclo A)



**Abb. 3-2:** Strukturformel Decylubiquinone (DCU)



**Abb. 3-3:** Strukturformel Ubiquinone 5 ( $Ub_5$ )

Nach 24, 48 und 72 h wurde das Auftreten eines CPE mikroskopisch bewertet. Um einen eventuellen Einfluss der verwendeten Substanzen auf die Replikation und Virusfreisetzung ausschließen zu können, wurde der Zellkulturüberstand gewonnen und das hierin enthaltene Virus titriert (3.2.4). Zusätzlich wurde Virusantigen mittels PLA angefärbt.

Die Wirkung von DCU, Cyclo A und  $Ub_5$  wurde zusätzlich in einer DNA-Leiteranalyse näher untersucht.

### 3.2.16 DNA-Leiteranalyse

Für die DNA-Leiteranalyse wurden  $2,5 \times 10^6$  FKN-Zellen in Gewebekulturschalen mit einem Durchmesser von 10 cm ausgesät und über Nacht inkubiert. Nach der Infektion mit BVD-Virus ( $1 \text{ ml KID}_{50} 10^{6,5}$ ) erfolgte die DNA-Extraktion alle 24 h. Hierfür wurden die Zellen mit Trypsin vom Untergrund gelöst und 5 min bei  $200 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert und in kaltem PBS resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl auf  $2 \times 10^6$  Zellen pro Ansatz eingestellt. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert und in 1 ml kaltem PBS aufgenommen. Die Zellsuspension wurde dann mit 10 ml eiskaltem 70 %-igem Ethanol versetzt, gut durchmischt und für mindestens 24 h bei  $-20^\circ\text{C}$  inkubiert. Die fixierten Zellen wurden erneut zentrifugiert und zweimal mit kaltem PBS gewaschen, um eventuell störende Ethanolreste zu entfernen. Das Zellpellet wurde in  $40 \mu\text{l}$  Phosphat-Citrat-Puffer resuspendiert und für 30 min bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 5 min bei  $1000 \times g$  wurde der Überstand in ein neues  $1,5 \text{ ml}$ -Reaktionsgefäß überführt und mit  $3 \mu\text{l}$  Nonidet-P40 (0,25 % in Aqua bidest) und  $3 \mu\text{l}$  RNase A (1 mg / ml in Aqua bidest) versetzt. Es erfolgte eine Inkubation für 30 min bei  $37^\circ\text{C}$ . Für den Verdau der Proteine wurden  $3 \mu\text{l}$  Proteinase K (1 mg / ml in Aqua bidest) hinzupipettiert und erneut für 30 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die eigentliche DNA-Leiteranalyse erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Hierfür wurden die Proben (Gesamtvolumen  $49 \mu\text{l}$ ) mit  $12 \mu\text{l}$  des 6 x konzentrierten DNA-Ladepuffers versetzt und  $15 \mu\text{l}$  des Probenansatzes elektrophoretisch aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte in einem 1,5 % TBE-Gel bei  $4 \text{ V} / \text{cm}$  Gellänge.

### 3.2.17 Darstellung der Calcium-Verteilung

Für die Untersuchung zur Lokalisation des als *second messenger* wirkenden Calciums im Verlauf der BVD-Virusinfektion wurde der Indikator Calcium Green 2 (CG-2; Molecular Probes) gewählt. CG-2 ist durch die Anwesenheit eines Acetoxymethylesters zellpermeabel und unterscheidet sich von CG-1 durch eine weitere Fluoreszenzreportergruppe. In Abwesenheit von freiem Calcium in der Zelle inhibieren sich diese Gruppen gegenseitig, so dass eine Lichtemission unterbleibt. CG-2 hat eine geringere Affinität zu Calcium und eignet sich dadurch gut für den Nachweis von höheren Konzentrationen.

Zum Calcium-Nachweis wurden 80.000 FKN-Zellen / ml auf Deckgläschen in Makrotiterplatten ausgesät und über Nacht vorkultiviert. Nach der Infektion der Zellen mit einer MOI = 1 wurden die Zellen nach 24 h p.i. mit PBS gewaschen und für 1 h mit CG-2 (5  $\mu$ M verdünnt in Kulturmedium) bei 37 °C inkubiert, erneut gewaschen und sofort im Fluoreszenzmikroskop begutachtet.

### 3.2.18 Enzymtests zum Nachweis der Caspasenaktivierung

Mit Hilfe geeigneter chromogener Substrate, die spezifisch von den einzelnen Caspasen erkannt und proteolytisch gespalten werden, war ein Nachweis der Aktivität möglich. Liegt im Zelllysate infolge einer Apoptoseinduktion das aktive Enzym vor, so kommt es zur Spaltung des Tetrapeptids hinter der Position vier und damit zur Freisetzung des Farbstoffs (THORNBERRY et al., 1994; TALANIAN et al., 1997). Diese Reaktion ist im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge  $\lambda = 405$  nm messbar. Proben mit besonders hoher Enzymaktivität bewirkten einen bereits für das bloße Auge sichtbaren Farbumschlag von farblos nach gelb.

#### Durchführung

Die Versuche wurden im Mikrotiterplattensystem durchgeführt. Hierfür wurden zunächst 50  $\mu$ l des zweifach-konzentrierten Reaktionspuffers in die Mikrotiterplatte vorgelegt. Anschließend wurden 50  $\mu$ l der Zelllysate, eingestellt auf ca. 300  $\mu$ g Protein (entspricht ca.  $2 \times 10^6$  Zellen), hinzugegeben und luftblasenfrei gemischt. Die Reaktion wurde mit der Zugabe des Substrats gestartet. Die Endkonzentration des Substrats betrug 50  $\mu$ M. Die Absorption wurde sowohl zu Beginn der Inkubation als auch nach 1 h Inkubation auf dem Schüttler bei 37 °C im ELISA-Reader gemessen. Der Versuch wurde drei Mal jeweils im Doppelansatz durchgeführt.

### 3.2.19 Inhibition der Caspasenaktivierung

Unter Verwendung des als Caspaseninhibitor wirkenden zellpermeablen Tripeptids Z-VAD-FMK können selektiv alle bisher bekannten Caspasen in ihrer Aktivität inhibiert werden. Um die Auswirkungen der Unterbrechung der Apoptosekaskade auf der Ebene der Caspasen im Verlauf der Infektion mit cp BVD-Virus zu untersuchen,



wurden  $8 \times 10^5$  FKN-Zellen auf Deckgläschen in Makrotiterplatten ausgesät und über Nacht inkubiert. Die Zugabe von Z-VAD-FMK erfolgte simultan zur Infektion mit dem cp BVD-Virus (MOI = 1) in einer Konzentration von  $50 \mu\text{M}$ . Aufgrund der geringen Halbwertszeit wurde das Tripeptid alle 12 h ergänzt. Nach 24, 48 und 72 h wurde das Auftreten eines CPE mikroskopisch bewertet. Die Zellkerne wurden zusätzlich mit dem fluoreszierenden Kernfarbstoff 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) in einer Konzentration von  $2 \mu\text{g} / \text{ml}$  Kulturmedium gefärbt. Er wurde ca. 12 h vor der mikroskopischen Auswertung ergänzt. Um einen eventuellen Einfluss des Inhibitors auf die Replikation und Virusfreisetzung ausschließen zu können, wurde der Zellkulturüberstand gewonnen und das hierin enthaltene Virus titriert (3.2.4). Zusätzlich wurde die Inhibition durch Z-VAD-FMK über einen Enzymtest der Caspase-3-Aktivität bestätigt (3.2.18), da sie als das Schlüsselenzym der Caspasenkaskade gilt.

### 3.2.20 Bestimmung des Zeitpunktes erster Caspasenaktivität

Das als zellpermeabler Inhibitor der Caspasenkaskade wirkende Tripeptid kann durch eine Markierung mit dem Fluoreszenz-Farbstoff FITC und eine verkürzte Inkubationszeit als Indikator für die Caspasenaktivierung genutzt werden. Auf diese Weise ist es im Gegensatz zum enzymatischen Nachweis möglich, aktivierte Caspasen direkt in der infizierten Zelle mittels Fluoreszenzmikroskopie darzustellen.

Hierfür wurden 80.000 FKN-Zellen / ml auf Deckgläschen in Makrotiterplatten ausgesät und über Nacht vorkultiviert. Nach der Infektion der Zellen mit einer MOI = 1 wurden die Zellen nach 8, 12, 16, 20 und 24 h p.i. mit PBS gewaschen und für 1 h mit FITC-VAD-FMK ( $20 \mu\text{M}$  verdünnt in  $250 \mu\text{l}$  Kulturmedium) bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert und erneut gewaschen. Nach einer Fixation mit Methanol-Aceton (1 min auf Eis) wurden die Zellen sofort im Fluoreszenzmikroskop begutachtet.

### 3.2.21 Durchflusszytometrie zum Nachweis der Caspasenaktivierung

Die mögliche Aktivierung der Caspasenkaskade in ncp BVD-virusinfizierten Zellen wurde in einer FACS-Analyse näher untersucht. Hierfür wurden  $2 \times 10^6$  FKN-Zellen im Doppelansatz in 10 cm-Kulturschalen ausgesät und am darauffolgenden Tag mit ncp BVD-Virus 7443 (MOI = 1) infiziert. Als Kontrolle dienten nicht infizierte und cp BVD-virusinfizierte Zellen. Nach 72 h p.i. wurden die Zellen mit Trypsin vom Untergrund gelöst und 7 min bei  $200 \times g$  und RT zentrifugiert und anschließend in vorgewärmtem Kulturmedium auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^6$  Zellen pro  $250 \mu\text{l}$  Medium eingestellt. Nach Zugabe des FITC-markierten, zellpermeablen Caspaseninhibitors FITC-VAD-FMK in einer Konzentration von  $4 \mu\text{M}$  wurden die Zellen für 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  auf einem Rotor inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit kaltem PBS wurde die Zellzahl auf  $10^5 / \text{ml}$  PBS eingestellt, und die Zellsuspension für die Auswertung mittels FACScan (Beckton Dickinson) in Waschpuffer aufgenommen.

### 3.2.22 RNA-Isolierung

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen erfolgte mit Hilfe des *RNeasy*-Kits (Qiagen). Der Zellrasen wurde zweimal mit kaltem PBS gewaschen, und die letzten Flüssigkeitsreste vor Zugabe des  $\beta$ -Mercaptoethanol-haltigen Lysispuffers QLT gut abgesaugt. Das Lysat wurde nach ca. dreiminütiger Inkubation bei RT mit einer Spritze homogenisiert, um die zelluläre DNA zu scheren und anschließend in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe des gleichen Volumens 70 %-igem Ethanol wurde das Lysat auf eine Silica-haltige Säule gegeben und 15 sec bei 10000 x g und RT zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen, und die Säulenmembran mehrmals gewaschen. Im letzten Schritt wurde die RNA in 30  $\mu$ l DEPC-Wasser eluiert und entweder direkt in die cDNA-Synthese eingesetzt oder bei  $-80$  °C gelagert. Wenn nötig, wurde die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt (3.2.27).

### 3.2.23 Reverse Transkription

Die cDNA-Synthese erfolgte nach dem im Anhang beschriebenen Protokoll. 6  $\mu$ l der zuvor isolierten Gesamt-RNA wurden in einem ersten Schritt unter Zugabe des Transkriptionspuffers, der Nucleotide und DEPC-Wasser für 5 min bei 70 °C denaturiert. Anschließend wurde die eigentliche reverse Transkription durch Zugabe der Hexamere und der reversen Transkriptase gestartet. Das Thermoprofil sowie die Zusammensetzung des RT-Reaktionsgemischs sind im Anhang gesondert aufgeführt. Die cDNA wurde sofort in eine PCR eingesetzt oder bei  $-20$  °C gelagert.

### 3.2.24 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde zur Amplifikation sowohl viraler als auch zellulärer Gensequenzen verwendet. Die verwendeten Primer sowie die Thermoprofile und Zusammensetzungen der Reaktionsgemische sind im Anhang aufgeführt.

### 3.2.25 Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden unter Verwendung von TBE- bzw. TAE-Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Beurteilung der Amplifikatgröße wurde zusätzlich ein 100 bp-DNA-Längenstandard aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 70 bzw. 130 V. Anschließend wurden die Gele zur Anfärbung der DNA-Fragmente für 3 min in eine Ethidiumbromidlösung (5  $\mu$ g / ml TBE-Puffer) gelegt, und die Fragmente über UV-Licht sichtbar gemacht. Die Ergebnisse wurden elektronisch dokumentiert.

### 3.2.26 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die Aufreinigung der PCR-Produkte sowie das nach einem Restriktionsverdau oder nach einer Ligation notwendige Umpuffern erfolgte unter Anwendung des *PCR Purification*-Kit (Qiagen).

### 3.2.27 Messung der DNA / RNA-Konzentrationen

Für Restriktions- und Ligationsansätze sowie vor der Sequenzierung und Transfektion von Plasmid-DNA wurde die DNA-Konzentration zuvor photometrisch bei einer Wellenlänge  $\lambda = 260$  nm gemessen und gemäß Gleichung 3.2 berechnet.

$$\text{DNA } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \text{OD}_{260} * 50 * \text{Verdünnungsfaktor} \div 1000$$

**Gleichung 3.2:** Kalkulation der DNA-Konzentration

Vor der semiquantitativen RT-PCR zur Untersuchung der bcl-2 RNA in BHV-1- und BVD-virusinfizierten Zellen wurde die RNA-Konzentration ebenfalls photometrisch gemessen und gemäß Gleichung 3.3 berechnet.

$$\text{RNA } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \text{OD}_{260} * 40 * \text{Verdünnungsfaktor} \div 1000$$

**Gleichung 3.3:** Kalkulation der RNA-Konzentration

Zur Überprüfung der Reinheit wurde zusätzlich die Extinktion bei  $\lambda = 280$  nm gemessen und der Quotient aus  $\text{OD}_{260}$  und  $\text{OD}_{280}$  gebildet. Werte über 1,7 entsprachen einer reinen DNA- bzw. RNA-Präparation.

### 3.2.28 Restriktionsverdau und Ligation

Um die PCR-Produkte in den geeigneten Vektor klonieren zu können, mussten zuvor sowohl das Amplifikat als auch der Vektor selbst mit bestimmten Restriktionsenzymen (RE) geschnitten werden. In der Regel wurde eine gerichtete Klonierung durchgeführt, was den korrekten Einbau des PCR-Produktes in den Vektor gewährleistet. Hierfür wurden stets zwei RE benötigt, die entweder gleichzeitig eingesetzt werden konnten, oder, bei unterschiedlichem Anspruch an das Puffersystem, hintereinander mit zwischengeschaltetem Umpuffern Verwendung fanden.

Gereinigtes Amplifikat	30 $\mu\text{l}$
10 x RE-Puffer	4,5 $\mu\text{l}$
BSA (wenn nötig)	4,5 $\mu\text{l}$
RE	30 U
H <sub>2</sub> O	ad 45 $\mu\text{l}$

Inkubation 60 – 90 min bei 37 °C

Sowohl der Vektor als auch das Amplifikat wurden vor der Ligation über eine Agarose-Gelelektrophorese in einem 1,5 % TAE-Gel aufgereinigt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei max. 4V / cm Gellänge. Das aufzureinigende Produkt wurde blind aus dem Gel herausgeschnitten, um die Interkalierung des Ethidiumbromids mit der

DNA zu unterbinden. Als Kontrolle diente ein Aliquot der geschnittenen Produkte. Die Abtrennung der DNA von der Agarose wurde über die Anwendung des „*Gel Extraction*“-Kits (Qiagen) erreicht.

Die Ligation des zu klonierenden Gens in den Zielvektor erfolgte über Nacht im Wasserbad bei 14 °C. Als Kontrolle für die Religation des Vektors diente ein Ansatz ohne Amplifikat. Das Verhältnis zwischen Amplifikat und Vektor sollte zwischen 2 : 1 und 3 : 1 liegen. Dies war auch von der Größe der beiden Ligationspartner abhängig.

Amplifikat 3 Teile	x,x µl
Vektor 1 Teil	4,5 µl
10 x Ligationspuffer	2,0 µl
T4-Ligase (Invitrogen)	10 U
H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

Inkubation über Nacht 14 °C

Nach der Ligation erfolgte eine Aufreinigung mittels *PCR Purification*-Kit. Der Ligationsansatz wurde in 30 µl Aqua bidest eluiert, da Salze die darauffolgende Elektroporation stören.

### 3.2.29 Elektroporation von Plasmid-DNA in *E.coli* XL1 blue

Die Vermehrung von Plasmid-DNA erfolgte in elektrokompetenten *E.coli* XL1 blue (Institut für Virologie). Hierfür wurden die Bakterien auf Eis leicht angetaut und max. 10 ng des Ligationsansatzes direkt hinzupipettiert. 40 µl der Bakterien wurden zügig und luftblasenfrei in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (2 mm) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 25 µF. Anschließend wurden die Bakterien in 1 ml SOC-Medium resuspendiert und 1 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert und daraufhin auf Selektionsagarplatten ausplattiert. Als Negativkontrolle wurde der Kontroll-Ligationsansatz stets mitelektroporiert. Die Platten wurden über Nacht (max. 16 bis 18 h) bei 37 °C inkubiert. Die Bakterienklone wurden mittels Kolonie-PCR gescreent.

### 3.2.30 Kolonie-PCR

Für die Kontrolle der Bakterienklone hinsichtlich der Vermehrung der Plasmid-DNA wurden zunächst 300 µl LB-Medium + Ampicillin (50 µg / ml) in 1,5 ml-Reaktionsgefäße vorgelegt. Anschließend wurde ein PCR-Mastermix angesetzt:

**Mastermix für 10 Ansätze**

dNTP	8,0 $\mu$ l
20 x Tth-Puffer	5,0 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	5,0 $\mu$ l
Tth-Polymerase (unverd.)	0,5 $\mu$ l
Sense-Primer (25 pmol)	1,0 $\mu$ l
Antisense-Primer (25 pmol)	1,0 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	79,5 $\mu$ l

$$\Sigma = 10 \mu\text{l}$$

Jeweils 10  $\mu$ l des Mastermix wurden in 0,5 ml-PCR-Reaktionsgefäßen vorgelegt. Mit einer sterilen Pipettenspitze wurden einzelne Bakterienkolonien gepickt und zunächst kurz in den PCR-Ansatz, dann in das Medium getaucht. Die Kulturansätze wurden für die Dauer der PCR und die darauffolgende Gelelektrophorese bei 37 °C und 200 rpm inkubiert und später ggf. als Vorkultur für die weitere Plasmidpräparation eingesetzt.

**3.2.31 Plasmid-Isolierung**

In der Kolonie-PCR als positiv getestete Bakterienklone wurden für Mini-Präparationen in 5 ml-Kulturen über Nacht bei 37 °C und 180 rpm herangezogen. Für MIDI-Präparationen wurden 50 ml bzw. 100 ml-Kulturen (low copy Plasmide) angeimpft. Die Plasmid-Isolierung erfolgte mittels *Plasmid-MiniPrep*- bzw. *Plasmid MidiPrep*-Kit laut Herstellerangaben (Fa. Qiagen). Die Plasmide wurden vor der Transfektion in eukaryotische Zellen mittels Sequenzierung auf die Richtigkeit ihrer Basenabfolge geprüft.

**3.2.32 Sequenzierung von Plasmid-DNA mit nicht-markierten Primern**

Die Sequenzierreaktion wurde mit Hilfe des *AutoRead<sup>TM</sup> Sequencing*-Kit (Amersham ehemals Pharmacia) durchgeführt. Sie basiert auf dem Prinzip der Kettenabbruchmethode nach Sanger (SANGER et al., 1976). Für die Reaktion wurden jeweils 3  $\mu$ g Plasmid-DNA und die im Anhang aufgeführten Sequenzierprimer in einer Konzentration von 10 pmol /  $\mu$ l verwendet.

10  $\mu$ l der Plasmid-DNA-Lösung sowie 2  $\mu$ l Primerlösung und 1  $\mu$ l NaOH wurden in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß gemischt und für 5 min bei 65 °C im Thermoblock denaturiert. Nach Zugabe von 1,5  $\mu$ l HCl und 2  $\mu$ l des Annealing-Puffers erfolgte das annealing bei 37 °C für 10 min mit weiteren 10 min Inkubation bei RT. Währenddessen wurde die Terminationsreaktion durch Vorlage von jeweils 3  $\mu$ l der jeweiligen ddNTPs in die Kavitäten einer auf Eis gelagerten Mikrotiterplatte vorbereitet. Im nächsten

Schritt erfolgte die Synthese der Komplementärstränge durch die T7 DNA Polymerase unter Einbau von Cy 5 markiertem dATP. Hierfür wurde 1 µl des markierten dATP mit 1,2 µl des Enzymverdünnungspuffers und 0,8 µl der T7 DNA Polymerase versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Die vorbereitete Mikrotiterplatte wurde auf 37 °C vorgewärmt. Nach Zugabe von 1 µl Verlängerungspuffer und 3,5 µl DMSO zum Sequenzieransatz wurden 5,4 µl auf die Mikrotiterplatte verbracht. Die Sequenzierreaktion wurde nach 5 min durch Zugabe von 6 µl Stopplösung beendet und bis zu Beginn der Gelelektrophorese bei -20 °C gelagert. Vor dem Auftragen wurden die Proben für 3 min auf 90 °C erwärmt.

Die Sequenziergel-Elektrophorese wurde mit Hilfe des Sequenzierautomaten *ALFexpress*<sup>®</sup> (Amersham Pharmacia) durchgeführt und analysiert. Hierfür wurde ein 9 %-iges Polyacrylamidgel mit einer Gelstärke von 0,5 mm gegossen und für mindestens 3 h zum Auspolymerisieren bei RT belassen. Als Puffer wurde 0,5 % TBE verwendet. Das Gel und der Puffer wurden auf eine Temperatur von 55 °C erwärmt, und die Taschen vor dem Auftragen der Proben mehrfach gründlich mit Puffer gespült. Die Laufbedingungen wurden wie folgt gewählt (Tabelle 3-6):

Laufzeit	900 min
Spannung	1500 V
Strom	60 mA
Leistung	28 W
Temperatur	55 °C
Messintervall	2 sec
Reportfunktion	Ja
Automatische Prozessierung	Ja

**Tabelle 3-6:** Laufbedingungen für die Sequenzierung von Plasmid-DNA

### 3.2.33 Auswertung der Gensequenzen und Ableitung der Proteinsequenz

Die Ableitung jeder Sequenz erfolgte aus mindestens zwei unabhängigen Sequenzierungen. Die vom Sequenzierautomaten erhaltenen Rohdaten wurden automatisch von der *ALFwin*<sup>TM</sup>-Software prozessiert. Um die komplementären und codogenen Sequenzen miteinander vergleichen zu können, wurden die komplementären Sequenzen mit Hilfe des Programms *SEQAID II*<sup>TM</sup> in codogene Sequenzen umgewandelt. Anschließend erfolgte die Translation im Alignment-Programm.

- *ALFwin*<sup>TM</sup>-Software: *ALFwin Control* version 2.00.15.a und *ALFwin Sequence Analyser* module v2.10.06, ©1996, 1997, 1998 Amersham/Pharmacia Biotech, Schweden

- *SEQAID II<sup>TM</sup>*: Version 3.81, ©1991 D. J. Roufa und D. D. Rhoads, Division of Biology, Kansas State University, USA
- *ALIGN<sup>PLUS</sup>*: Sequence Alignment Programm Version 2.0, ©1989, 1992, Scientific & Educational Software.

### 3.2.34 Transfektion von Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen

#### *Calcium-Phosphat-Methode*

Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen so ausgesät, dass sie sich am Tag der Transfektion in der logarithmischen Wachstumsphase befanden (50 - 80 % Konfluenz). Für die Transfektion wurden max. 40 µg DNA zunächst in 220 µl 0,1 x TE-Puffer resuspendiert, mit 250 µl 2 x HBS-Puffer versetzt und 30 sec gevortext. Es folgte die Zugabe von 31 µl 2 M CaCl<sub>2</sub> direkt auf dem Vortex. Anschließend wurde der Ansatz für 30 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurden die Zellen präpariert. Pro Transfektionsansatz wurden 1 -2 x 10<sup>6</sup> Zellen benötigt. Sie wurden nach zweimaligem Waschen mit dem Transfektionsansatz resuspendiert, für 15 min bei RT inkubiert und unter Zugabe von 4,5 ml serumhaltigem Medium in 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen gegeben.

#### *Transfektion mit Lipofectamine 2000 (Invitrogen)*

Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in Makrotiterplatten derart ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion zu 90 – 95 % konfluent waren. Pro Vertiefung wurden 0,8 – 1,2 µg DNA mit 50 µl serum- und antibiotikafreiem Medium verdünnt. Das Transfektionsreagenz Lipofectamine 2000 wurde ebenfalls in serum- und antibiotikafreiem Medium angesetzt. Für eine Vertiefung wurden 2 µl des Lipofectamine 2000 in 50 µl Medium angesetzt und zunächst 5 min bei RT inkubiert, bevor die DNA hinzugegeben und für weitere 20 min bei RT inkubiert wurden. Die daraus resultierenden 100 µl des Transfektionsansatzes wurden direkt auf die zuvor mit PBS gewaschenen Zellen gegeben und für 24 bis 48 h weiterkultiviert.

### 3.2.35 Bestimmung der Transfektionseffizienz

Für die Bestimmung der Transfektionseffizienz wurden 5x10<sup>5</sup> Zellen / 5 ml Medium in 6 Well-Platten ausgesät, über Nacht vorinkubiert und am darauffolgenden Tag transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, mit PBS gewaschen und anschließend mit Methanol-Aceton fixiert. Der spezifische Nachweis erfolgte mittels Immunfluoreszenz (3.2.38). Die Auszählung wurde in einer Thoma-Zählkammer unter Phasenkontrast mit überlagerter Fluoreszenzanregung durchgeführt und wurde zweimal wiederholt. Es wurden jeweils mindestens 100 Zellen gezählt.

### 3.2.36 ELISA zum Nachweis von rekombinantem E<sup>rns</sup>

Das Glykoprotein E<sup>rns</sup> wird von BVD-virusinfizierten Zellen in den Zellkulturüberstand sezerniert (BRUSCHKE et al., 1997). Um zu prüfen, ob das rekombinante E<sup>rns</sup> dieselbe

Eigenschaft zeigte, wurde der kommerziell erhältliche *Antigen-Capture-ELISA* Chekit II (Bommeli AG) verwendet. Er basiert auf einer Detektion des E<sup>ms</sup> über an eine Festphase gekoppelte, gegen das E<sup>ms</sup> gerichtete, monoklonale Antikörper (mAk). Diese Antigen-Antikörperreaktion wird über einen zweiten mAk und eine anschließende Substratreaktion sichtbar gemacht.

Für den Test wurde der Zellkulturüberstand transfizierter Zellen gewonnen und bei 200 x g für 7 min zentrifugiert, um Zelldebris zu sedimentieren. Der aufgereinigte Zellkulturüberstand wurde direkt im ELISA eingesetzt. Die Durchführung erfolgte gemäß Herstellerangaben. Als Positivkontrolle diente Zellkulturüberstand mit cp BVD-Virus NADL infizierter Zellen.

### 3.2.37 Etablierung von stabil exprimierenden Zelllinien

1,5 x 10<sup>6</sup> PT-Zellen wurden in 5 ml EMEM + 10 % FKS inkubiert und am darauffolgenden Tag mittels Calcium-Phosphat-Transfektion mit den Plasmiden transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde dem Medium das Antibiotikum Zeocin in einer Konzentration von 1 mg/ml zugesetzt. Alle drei Tage erfolgte ein Medienwechsel. Als Kontrolle für das Absterben der Zellen wurde eine nicht transfizierte Zellkultur mitgeführt. Die überlebenden Zellen wurden vereinzelt und in Mikrotiterplatten ausgesät (statistisch 3 Zellen/cup). Die Zeocin-Konzentration wurde zu diesem Zeitpunkt auf 0,5 mg/ml reduziert. Gut wachsende Zellklone wurden zunächst auf Makrotiterplatten und später in 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen umgesetzt. Zu diesem Zeitpunkt wurden sie erstmals mittels Ak-Screening auf eine Proteinexpression hin untersucht. Positive Klone wurden gesplittet und bei -80 °C eingefroren bzw. weiter kultiviert und näher charakterisiert. Sie wurden zweimal rekloniert.

### 3.2.38 Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenz wurden 80.000 Zellen/ml auf Deckgläschen in Makrotiterplatten ausgesät und über Nacht inkubiert. Vor der Fixation wurden sie drei Mal mit 1/3 PBS gewaschen und anschließend für 3 h bei 80 °C hitzefixiert bzw. für 1 min mit Methanol-Aceton (Verhältnis 1 : 1) fixiert. Die Antikörper wurden in *Blocking* Reagenz (Roche) verdünnt, um unspezifische Bindungen zu reduzieren. Die Reaktion mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen mit 1/3 PBS wurde der Sekundärantikörper für 3 h bei 4 °C zugesetzt. Die Zellen wurden erneut gewaschen und schließlich mit Mowiol (Merck) eingedeckt, um die Färbung zu konservieren. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop. Die Ergebnisse wurden elektronisch gespeichert.

### 3.2.39 Charakterisierung der stabil exprimierenden Zellen

Die transfizierten PT-Zellen wurden mit folgenden Methoden näher charakterisiert: Zum einen wurden die Zellen wiederholt mittels spezifischer Antikörper im PLA auf



die Expression des transfizierten Gens hin untersucht. Zum anderen wurde die Kernmorphologie über eine DAPI-Färbung kontrolliert, um Rückschlüsse auf die Auswirkung der stabilen Expression auf die Kultur ziehen zu können. Klone, die infolge der Expression eine veränderte Morphologie aufwiesen, wurden mit Hilfe einer Färbung des zellulären Proteins Cytokeratin identifiziert, welches für Epithelzellen charakteristisch ist. Klone mit fibroblastoidem Wachsstum wurden verworfen. Ein weiteres wichtiges Auswahlkriterium war die Permissivität für das BVD-Virus.

#### **3.2.40 PCR und *real-time* PCR zum Nachweis der bcl-2-RNA**

Basierend auf der Arbeit von Devireddy und Mitarbeitern (DEVIREDDY und JONES, 1999) wurde eine PCR etabliert, die Aufschlüsse über das Schicksal des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 im Verlauf der Infektion mit cp BVD-Virus auf mRNA-Ebene geben sollte. Hierfür wurden sowohl PT-Zellen als auch die Bcl-2 überexprimierenden PT-Zellen mit dem cp Biotyp in einer MOI = 1 infiziert, und die RNA über einen Zeitraum von sechs Tagen alle 24 h isoliert. Zum Vergleich wurden die Zellen mit dem BHV-1-Stamm Colorado infiziert. Die RNA-Konzentration wurde im Dreifachansatz photometrisch bestimmt. Für die anschließende Reverse Transkription (3.2.23) wurden 3 µg RNA eingesetzt. Die PCR wurde mit bcl-2-spezifischen Primern durchgeführt. Als zusätzliche Kontrolle für die Verwendung vergleichbarer RNA-Konzentrationen wurde in einer weiteren PCR das *house keeping gene* Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) nachgewiesen. Die Expression dieses zellulären Enzyms ist abhängig vom Gewebetyp, so dass direkte Vergleiche zwischen verschiedenen Organen nicht möglich sind (PIECHACZYK et al., 1984; TRICARICO et al., 2002; MOZDZIAK et al., 2003). Auch eine Translokation der GAPDH vom Cytosol in den Zellkern apoptotischer Zellen wurde postuliert (ISHITANI et al., 2003). In Vorversuchen konnte jedoch gezeigt werden, dass die Expression des Enzyms in der verwendeten Zellpopulation konstant bleibt und durch apoptotische Prozesse in der Zelle nicht beeinflusst wird.

Zusätzlich wurde eine *real-time* PCR etabliert, um Schwankungen des bcl-2-mRNA-Niveaus quantifizieren zu können. Als Standard diente eine Verdünnungsreihe des Plasmids pcB, welches das bcl-2-Gen enthielt. Er deckte einen Bereich von  $10^1$  bis  $10^7$  Kopien pro Testansatz ab, so dass anhand dieser Vergleichswerte Rückschlüsse auf die Kopienzahl in den Proben möglich waren. Die *real-time* PCR wurde unter Verwendung des Mastermix *Brilliant SYBR Green QPCR* (Stratagene) angesetzt. Das Thermoprofil und die Zusammensetzung des Reaktionsgemischs sind im Anhang aufgeführt. Die *real-time* PCR wurde am MX 4000 (Stratagene) durchgeführt.



## 4 Eigene Untersuchungen

### 4.1 Untersuchung des E<sup>rns</sup> als potentieller Apoptoseinduktor

Versuche aus dem Jahr 1997 (BRUSCHKE et al., 1997) zeigten, dass aufgereinigtes E<sup>rns</sup> des CSF-Virus in der Lage ist, in Lymphocytenkulturen Apoptose zu induzieren und damit möglicherweise eine wichtige Rolle im Verlauf der Pathogenese der Pestiviren spielt. Um die potentielle Beteiligung des Glykoproteins E<sup>rns</sup> an der Apoptoseinduktion in mit cp BVD-Virus infizierten Zellen näher zu charakterisieren, sollte zunächst ein Vergleich der Aminosäuresequenzen unterschiedlicher Virusisolate vollzogen werden. Hierfür wurden sowohl cp als auch ncp Biotypen sowie ein BVD-Virus-II-Isolat einbezogen.

#### 4.1.1 Klonierung und Sequenzierung des E<sup>rns</sup>-Gens

Für die Untersuchungen zur Funktion des E<sup>rns</sup> im Verlauf der Infektion wurde das Gen mittels RT-PCR aus der RNA infizierter Zellkulturen amplifiziert. Es wurde sowohl das E<sup>rns</sup> aus dem Laborstamm NADL als auch das aus dem ncp BVD-Virus 7443 amplifiziert und kloniert. Zusätzlich wurde auch eine Amplifikation des E<sup>rns</sup> des cp 5569 (*matching pair*) und des Genotyp II-Isolats 104 / 98 durchgeführt. Die Amplifikation aus dem ncp 5569 gelang mit den verwendeten Primern nicht. Je nachdem, für welchen Vektor das Amplifikat bestimmt war, wurde die benötigte Signalsequenz für den gerichteten Transport hinzugefügt (z.B. pcEcG). Für die Konstruktion der pSeqTag-Plasmide wurde das E<sup>rns</sup> ohne Signalsequenz und ohne eigenes Startcodon amplifiziert. Tabelle 4-1 gibt eine Übersicht über die erzeugten Konstrukte und deren Bezeichnungen.

Virus	pcDNA 3.1 Zeo +		pSeqTag 2B Start- / Stop +
	Signalseq. -	Signalseq. +	
NADL	pcEc-N	pcEcG-N	pSEc-N
7443	pcEn-7	PcEnG-7	pSEn-7
cp5569	pcEc-5	pcEcG-5	pSEc-5
nep 5569	n.d.	n.d.	n.d.
104 / 98	pcEn-104	PcEnG-104	pSEn-104

**Tabelle 4-1:** Bezeichnung der einzelnen  $E^{ms}$ -Konstrukte. Die codierende Sequenz des  $E^{ms}$  wurde ausgehend von vier verschiedenen BVD-Virusstämmen amplifiziert und in den Vektor pSeqTag 2B kloniert. Daraus resultierten die Konstrukte „pSEc“ für das  $E^{ms}$  aus cp Stämmen bzw. „pSEn“ für das  $E^{ms}$  aus nep Stämmen. Des Weiteren wurde das  $E^{ms}$  in den Vektor pcDNA 3.1. Zeo<sup>+</sup> kloniert. Daraus resultierten die Konstrukte „pcEc“ (cp BVD-Virus) und „pcEn“ (nep BVD-Virus). Sie enthielten im Gegensatz zu den Konstrukten „pcEcG“ und „pcEnG“ keine Signalsequenz für den gerichteten Transport.

Die Amplifikate wurden aufgereinigt, mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und in die jeweiligen Vektorsysteme ligiert. Anschließend erfolgte die Vermehrung der Plasmide in *E.coli* XL 1 blue. Positive Bakterienklone wurden mittels Kolonie-PCR identifiziert und für weitere Plasmidpräparationen verwendet. Die aufgereinigten Plasmide wurden sequenziert und mit Hilfe des Computerprogramms ALIGN analysiert. Die abgeleiteten Proteinsequenzen sind in Abb. 4-1 gezeigt.

Referenzmolekül:	cp BVD-Virus NADL	( 245 aa)	Homologie
Sequenz 2:	ncp BVD-Virus 7443	( 245 aa)	94%
Sequenz 3:	ncp BVD-Virus 104/98	( 245 aa)	80%
Sequenz 4:	cp BVD-Virus 5569	( 245 aa)	90%
Sequenz 5:	ncp BVD-Virus SD-1	( 245 aa)	93%
Sequenz 6:	cp BVD-Virus Osloss	( 245 aa)	88%
cp NADL	( 1)	ALLAWAIIAIVLFQVTMGENITQWNLQDNGTEGIQRAMFQRGVNRSLHGI	
ncp 7443	( 1)	.....L....V.....	
ncp 104/98	( 1)	.....L.A..L.QVT.....M.....L.....	
cp 5569	( 1)	.....L.....	
ncp SD-1	( 1)	.....L.V..IE.....	
cp Osloss	( 1)	.....V..L....AV.....	
cp NADL	( 51)	WPEKICTGVPSHLATDIELKTIHGMMDASEKTNYYCCRLQRHEWNRKHGWC	
7443ERNSTXT	( 51)	.....V.....	
ncp 104/98	( 51)	.....T.....Y...E.E.....	
cp 5569	( 51)	.....T...A.....	
ncp SD-1	( 51)	.....V.....	
cp Osloss	( 51)	.....T...A.....	
cp NADL	( 101)	NWYNIEPWILVMNRTQANLTEGQPPRECAVTCRYDRASDLNVVTQARDSP	
ncp 7443	( 101)	.....I..K.....D.....	
ncp 104/98	( 101)	..FH.....WL..K..S.....L.....ETE..I.....R.	
cp 5569	( 101)	.....L..K.....KD.....	
ncp SD-1	( 101)	.....I.....D.....	
cp Osloss	( 101)	.....VL..K....A.....D.....N..	
cp NADL	( 151)	TPLTGCKKGNFSFAGILMRGPCNFEIAASDVLVFKHEHERISMFQDTTLYL	
ncp 7443	( 151)	.....R..DCT.V...AH..	
ncp 104/98	( 151)	.T.....VLN.....KVSVEE.....DCGN.L.E.AIQ.	
cp 5569	( 151)	.Q.....VQ.....M.V.....DCTGV...AAH..	
ncp SD-1	( 151)	.....V.T.....CTGV...AH..	
cp Osloss	( 151)	.....V.VQ.....V....R..DCT.VI.G.AH..	
cp NADL	( 201)	VDGLTNSLEGARQGTAKLTTWLKGQLGILGKKLENKSKTWFAY	
ncp 7443	( 201)	..M.....S.....	
ncp 104/98	( 201)	L..A..TI...V.....V.....	
cp 5569	( 201)	..M.....S.....R.....H.	
ncp SD-1	( 201)	..V.....S.....	
cp Osloss	( 201)	..M.....S.....R..KK.....	

**Abb. 4-1:** Abgeleitete Aminosäuresequenzen des E<sup>ms</sup> der untersuchten BVD-Virusstämme. Die Bereiche mit RNase-Aktivität sind *rot* unterlegt. Sie liegen im Gegensatz zu den N- und C-Termini hochkonserviert vor.

Die Aminosäuresequenzen des E<sup>ms</sup> der untersuchten BVD-Viren zeigte deutliche Unterschiede im Vergleich zum Referenzstamm NADL. So variierten beispielsweise die N'-Termini. In dieser Region ist die Signalsequenz zum Transport in das ER lokalisiert. Auch die C'-Termini zeigten Unterschiede in der Aminosäuresequenz. Allen gemeinsam waren jedoch die hochkonservierten Bereiche, die möglicherweise RNase-Aktivität besitzen. Hier wurden keine relevanten Mutationen gefunden, was für eine große Bedeutung dieser Domäne spricht.

#### 4.1.2 Transiente Expression und Lokalisation des rekombinanten E<sup>rns</sup>

Die unterschiedlichen E<sup>rns</sup>-Konstrukte wurden in einer für das BVD-Virus permissiven bovinen Zelllinie exprimiert, um die Lokalisation des rekombinanten Proteins im Vergleich zur Infektion zu analysieren. Hierfür standen MDBK, PT und FKN-Zellen zur Verfügung. Zur Prüfung der Transfektionseffizienz wurden zusätzlich cos-7-Zellen aus der Niere der Grünen Meerkatze hinzugezogen, da sie sich leicht transfizieren lassen. Die Zellen wurden mittels Lipofectamine 2000-Reagenz transfiziert und die Expression anschließend in der Immunfluoreszenz begutachtet (Abb. 4-2). Zusätzlich wurde die Transfektionseffizienz ermittelt. Die Ergebnisse hierfür sind in der Tabelle 4-2 zusammengefasst.

Konstrukt	Transfektionseffizienz [%]			
	cos-7	MDBK	PT	FKN
pcEc	0	0	0	toxisch
pcEn	0	0	0	toxisch
pcEcG	30	1	20	toxisch
pcEnG	30	1	20	toxisch
pSEc	40	1	25	toxisch
pSEn	40	1	25	toxisch

**Tabelle 4-2:** Ermittlung der Transfektionseffizienz in den untersuchten Zellkulturen in Abhängigkeit vom verwendeten Konstrukt. Die bovinen Zellen MDBK und FKN eigneten sich nicht. Lediglich die PT-Zellen erreichten 20 – 25 % Effizienz und wurden daher für die weiteren Versuche ausgewählt. Die als Kontrollen mitgeführten cos-7-Zellen erreichten Werte bis zu 40 %.

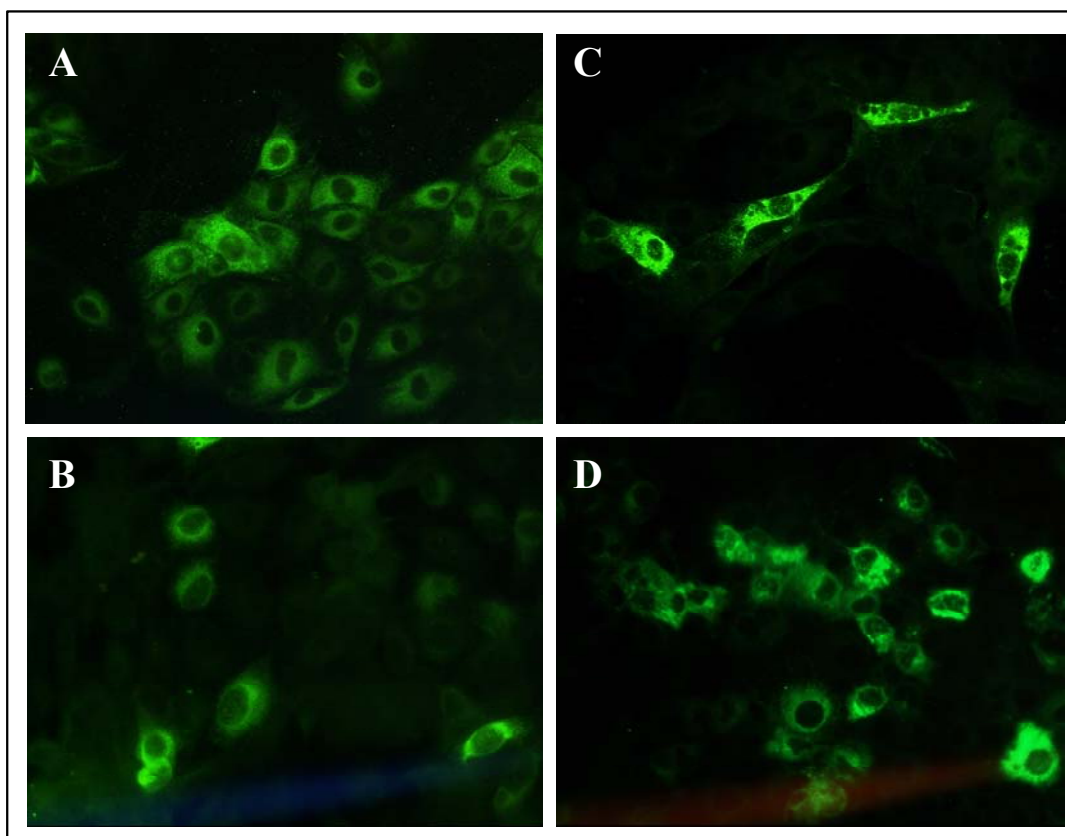
FKN-Zellen waren für die Transfektion von Plasmid-DNA nicht geeignet, da das Transfektionsreagenz cytotoxisch wirkte. Auch die Verwendung anderer Methoden erbrachte die gleichen Resultate, so dass FKN-Zellen für die weiteren Versuche nicht mehr in Betracht kamen.

Die Expression des rekombinanten E<sup>rns</sup> in MDBK-Zellen war unabhängig vom verwendeten Konstrukt sehr ineffizient. Das rekombinante Protein konnte in maximal 1 % der Zellen nachgewiesen werden. Dementsprechend konnte auch die für viele Versuche als Standard-Zelllinie geltenden MDBK für die stabile Expression nicht genutzt werden.

Lediglich PT-Zellen eigneten sich für die Transfektion, erreichten mit einer Effizienz von maximal 25 % jedoch nicht die Werte der cos-7-Zellen.

Das E<sup>rns</sup> ist in mit BVD-Virus infizierten Zellen um den Kern in Assoziation mit dem ER lokalisiert (GRUMMER et al., 2001). In Zellen, die mit den Konstrukten

pcEcG / pcEnG transfiziert wurden, konnte unabhängig vom Virusisolat eine vergleichbare Lokalisation des rekombinanten Proteins nachgewiesen werden. Es waren keinerlei Unterschiede zwischen cp und ncp  $E^{ms}$  erkennbar. Im Gegensatz dazu führte die Expression mit dem verkürzten  $E^{ms}$  (pcEc / pcEn) nicht zur Bildung eines rekombinanten Proteins. Dies erklärt die Notwendigkeit für das Vorhandensein der Signalsequenz bestehend aus dem C-Terminus des Capsid-Proteins. Auch die Transfektion mit den Plasmiden, die eine Sezernierung des  $E^{ms}$  in den ZKÜ gewährleisten sollten (pSEc / pSEn), führten zur  $E^{ms}$ -Expression mit vergleichbarer Lokalisation in der Zelle. Zur besseren Übersicht sind in Abb. 4-2 lediglich die Ergebnisse der Transfektion der PT-Zellen mit den Konstrukten basierend auf dem  $E^{ms}$  des cp BVD-Virus NADL dargestellt. Als Kontrolle sind cos-7-Zellen, transfiziert mit dem Konstrukt pcEcG, abgebildet.



**Abb. 4-2:** Transiente Expression des  $E^{ms}$  in PT-Zellen. (A) PT infiziert mit cp NADL; (B) PT transfiziert mit pcEcG-N; (C) PT transfiziert mit pSEc-N; (D) cos-7 transfiziert mit pcEcG-N (Immunfluoreszenz: Vergrößerung: 220 x).

Da das  $E^{ms}$  von BVD-virusinfizierten Zellen teilweise in den ZKÜ sezerniert wird, sollten die transfizierten Zellen auf eine potentielle Sezernierung des rekombinanten  $E^{ms}$  hin untersucht werden. Hierfür wurde der ZKÜ in den Chekit II-ELISA (Dr. Bommeli AG) eingesetzt. Als Positivkontrolle diente ZKÜ infizierter PT-Zellen. Keines der hier getesteten  $E^{ms}$ -Konstrukte führte zu einer Sezernierung des rekombinanten  $E^{ms}$ .

### 4.1.3 Stabile Expression des E<sup>rns</sup> in bovinen Zellen

Für die nachfolgenden Versuche zur Klärung der Funktion des E<sup>rns</sup> sollte eine bovine Zelllinie etabliert werden, die das Glykoprotein stabil exprimiert. Hierfür wurden PT-Zellen mit dem rekombinanten E<sup>rns</sup> basierend auf dem NADL-Genom mittels Calcium-Phosphat-Methode transfiziert (pcEcG) und mittels Zeocin auf ihre Expression selektiert. Sollte das E<sup>rns</sup> allein in der Lage sein, Apoptose zu induzieren, dürfte die konstitutive Expression nicht möglich sein.

Die positiven Klone 1B3, 1D7, 1F6, 1G6, und 7E10 wurden nach wiederholtem Screening mit den mAk C12, C42 und C46 für weiterführende Versuche ausgewählt. Sie behielten ihre epitheloide Morphologie und zeigten weder signifikante Veränderungen in der Kernmorphologie noch erhöhte Sterberaten. Außerdem ließen sie sich sowohl mit cp als auch mit ncp BVD-Virus infizieren. Da die Zellen nach der Transfektion mit dem E<sup>rns</sup> keinerlei Anzeichen eines CPE aufwiesen, ist davon auszugehen, dass das E<sup>rns</sup> allein in den untersuchten Zelllinien keinen CPE induzieren kann.

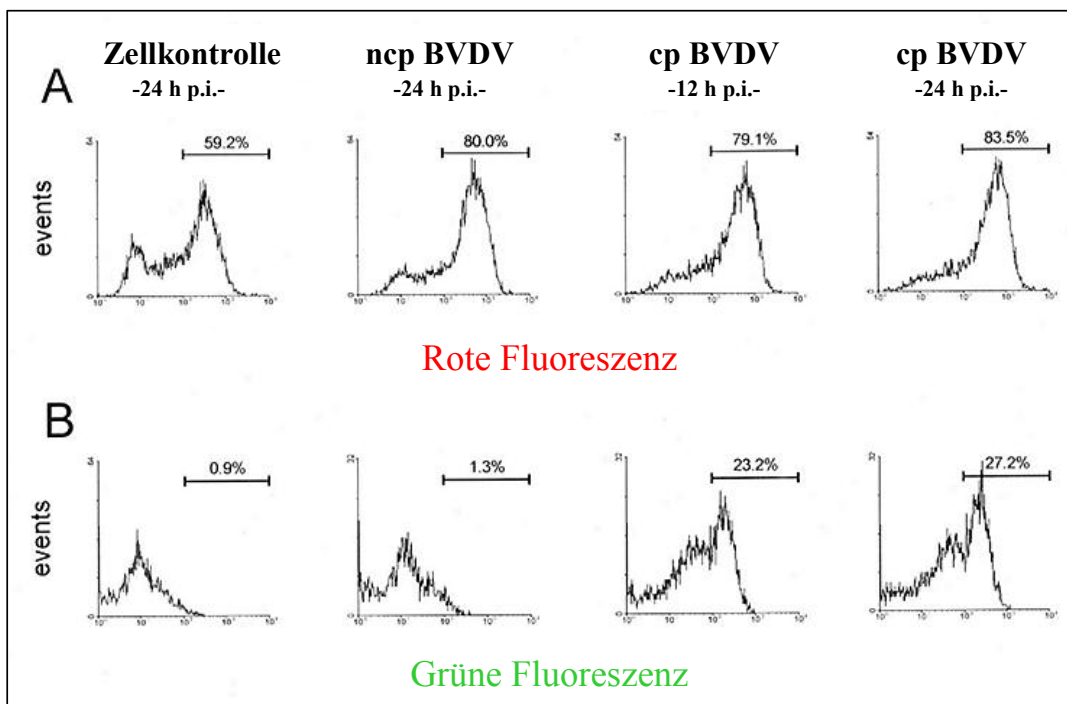
## 4.2 Charakterisierung des Apoptoseweges

Untersuchungen aus dem Jahr 1998 beschäftigten sich mit der Suche nach einem löslichen Faktor X, der von mit dem cp BVD-Virus infizierten Zellen sezerniert wird und möglicherweise in der Lage sein könnte, in nicht infizierten Zellen Apoptose zu initiieren (GRUMMER, 1999b). Hierfür wurde der Zellkulturüberstand von infizierten Zellen gewonnen, durch UV-Strahlung inaktiviert und anschließend auf eine neue Zellkultur gegeben. Da eine Apoptoseinitiation in diesen Zellen unterblieb, ist der Apoptoseweg über den „*extrinsic pathway*“ infolge einer Infektion mit dem cp BVD-Virus *in vitro* sehr unwahrscheinlich. Basierend auf diesen Ergebnissen sollte in dieser Arbeit die mögliche Initiation über den „*intrinsic pathway*“ analysiert werden.

### 4.2.1 Analyse des mitochondrialen Transmembranpotentials $\Delta\Psi_m$

Zur Untersuchung des  $\Delta\Psi_m$  wurde der Fluoreszenzfarbstoff DePsipher<sup>TM</sup> als Marker für die Aktivität der Mitochondrien verwendet. Die FACS-Analyse zeigte eine deutliche rote Fluoreszenz sowohl in den Zellkontrollen als auch in den Zellen, die mit dem ncp BVD-Virus infiziert waren (Abb. 4-3).





**Abb. 4-3:** Analyse des mitochondrialen Transmembranpotentials  $\Delta\Psi_m$  in mit BVD-Virus infizierten Zellen mittels Durchflusszytometrie. Die rote Fluoreszenz (**A**) korreliert mit einem intakten, die grüne Fluoreszenz (**B**) mit einem veränderten Membranpotential. Die Infektion mit cp BVD-Virus führte zu einer Veränderung des  $\Delta\Psi_m$ .

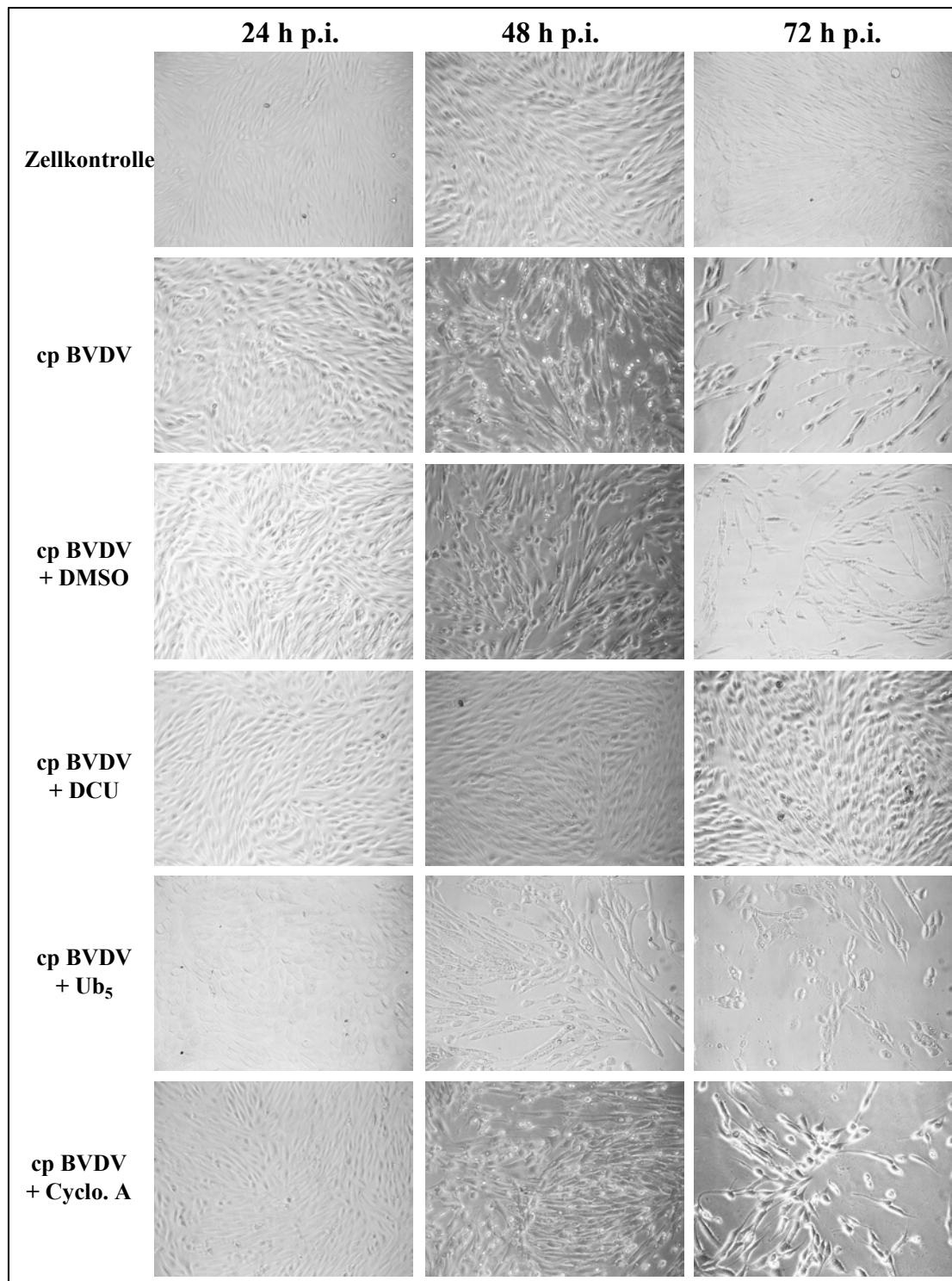
Dies deutete auf ein intaktes Transmembranpotential  $\Delta\Psi_m$ . Im Gegensatz dazu zeigte sich in den mit cp BVD-Virus infizierten Zellen bereits 12 h p.i. ein deutlicher Anstieg der Anzahl von Zellen mit grüner Fluoreszenz und dementsprechend mit verändertem  $\Delta\Psi_m$ . Hier beliefen sich die Werte auf 0,9 % grüne Fluoreszenz im Vergleich zu 27,2 % in cp BVD-virusinfizierten Zellen 24 h p.i.. Die erhöhten Werte der roten Fluoreszenz in mit ncp BVD-virusinfizierten Zellen gegenüber der nicht infizierten Kontrolle (ca. 80 % gegen 59,2 %) könnten auf einen erhöhten Energiebedarf der Zellen infolge der viralen Replikation zurückzuführen sein.

#### 4.2.2 Beteiligung der permeability transition pore

Um eine potentielle Beteiligung der PTP im Verlauf der cp BVD-virusinduzierten Apoptosekaskade näher untersuchen zu können, wurde die Wirkung der PTP-Inhibitoren DCU sowie des Cyclo A und des Ub<sub>5</sub> auf das Auftreten eines CPE analysiert. Hierfür wurden FKN-Zellen mit cp NADL infiziert und simultan mit jeweils einer der Substanzen versetzt. Der Effekt der Substanzen auf die Zellkultur wurde sowohl mikroskopisch (Abb. 4-4) als auch mittels DNA-Leiteranalyse (Abb. 4-5) untersucht.

FKN-Zellen, die mit dem cp BVD-Virus infiziert waren, zeigten bereits 24 h p.i. erste deutliche morphologische Veränderungen wie Vakuolisierung und Kernpyknose. 48 h p.i. konnte die Fragmentierung der DNA ebenfalls nachgewiesen werden.

Die Inkubation mit Ub<sub>5</sub> konnte das Auftreten des CPE weder inhibieren noch verzögern.

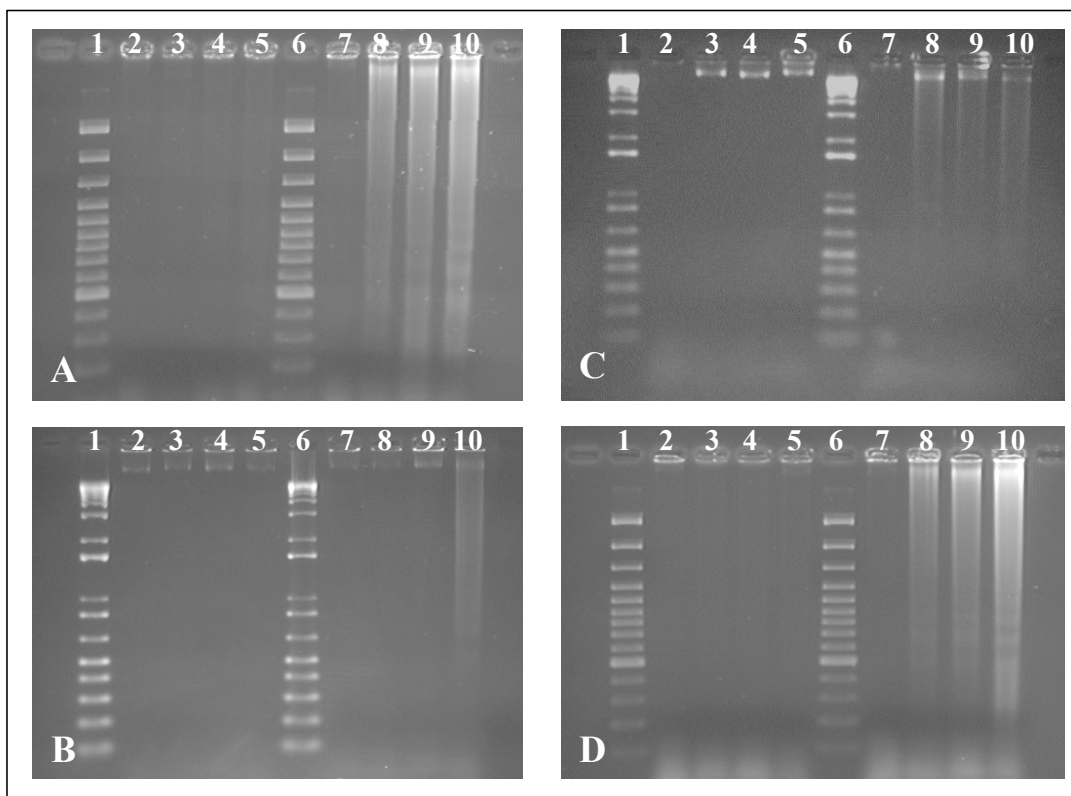


**Abb. 4-4:** Wirkung von DCU, Ub<sub>5</sub> bzw. Cylo A auf die Infektion mit cp BVD-Virus. Lediglich die Inkubation mit DCU verzögerte das Auftreten des CPE. (Phasenkontrast, Vergrößerung: 80 x).

Demgegenüber führte die simultane Inkubation einer mit dem cp BVD-Virus infizierten Zellkultur mit DCU zu einer deutlichen Verzögerung des CPE. Erste morphologische

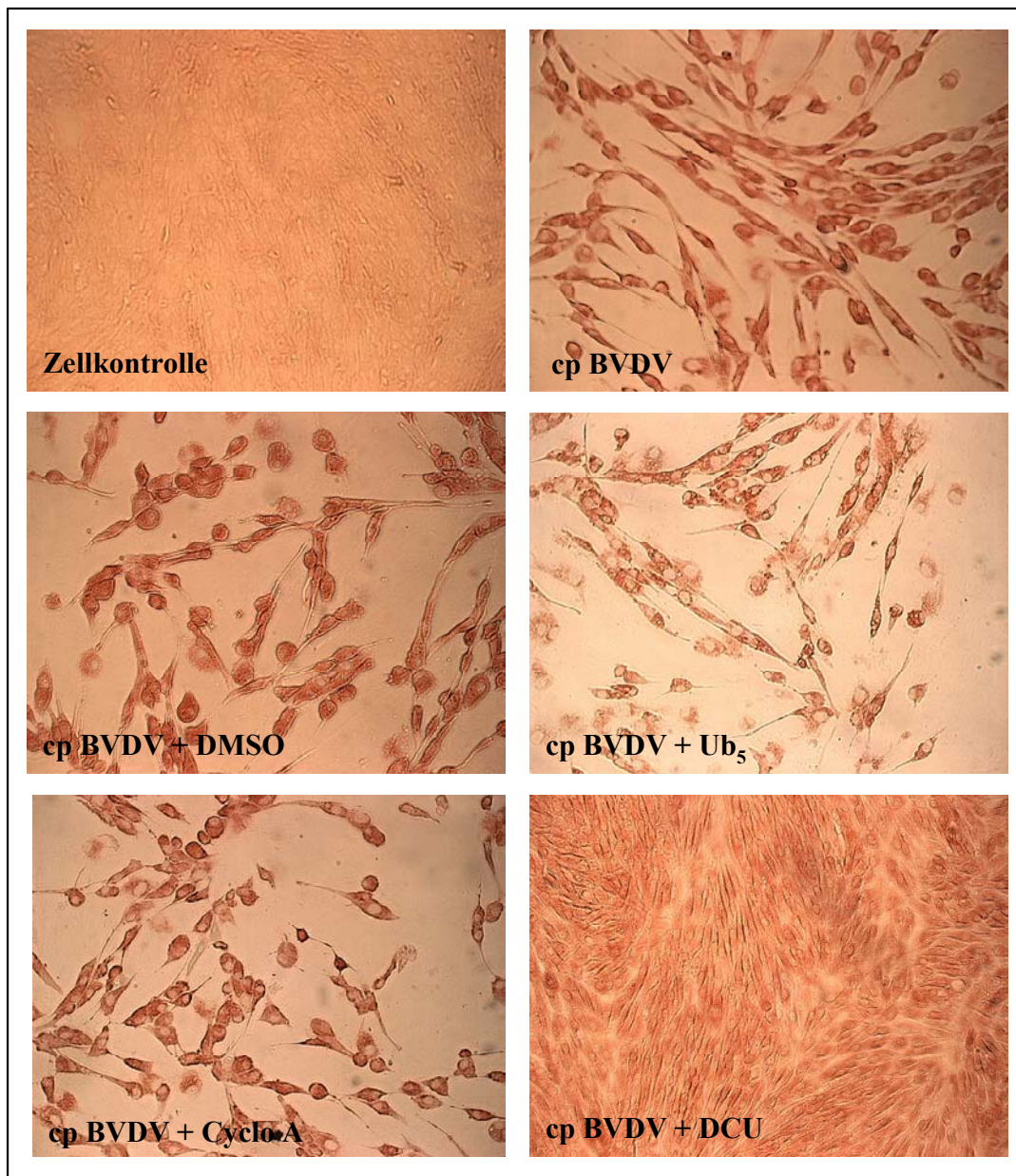
Veränderungen traten erst 72 h p.i. auf. Die Fragmentierung der DNA konnte erst 96 h p.i. nachgewiesen werden.

Cyclo A konnte das Auftreten des CPE nur kurzfristig hinauszögern. Bereits 72 h p.i. zeigten die Zellen einen mit der Viruskontrolle vergleichbaren CPE. Der Zellrasen war zu 60 % zerstört.



**Abb. 4-5:** DNA-Leiteranalyse von unbehandelten FKN-Zellen (**A**) und nach Zugabe von DCU (**B**), Ub<sub>5</sub> (**C**) und Cyclo A (**D**). 1 und 6: DNA-Längenstandard; 2 – 5: nicht infizierte Kontrollen 24, 48, 72, 96 h p.i.; 7 – 10: mit cp BVD-Virus infizierte Zellen 24, 48, 72, 96 h p.i.. In mit cp BVD-Virus infizierten Zellen, die mit DCU behandelt wurden, war die charakteristische DNA-Fragmentierung erst 96 h p.i. nachweisbar.

Die Virusreplikation wurde von keiner der drei Substanzen signifikant beeinflusst. Die Immunfärbung der Zellen nach 72 h p.i. zeigte, dass der Zellrasen auch hier zu 100 % infiziert war (Abb. 4-6). Die Titer erreichten mit oder ohne Inhibitoren Werte von  $10^{5,0}$  KID<sub>50</sub> / ml (24 h p.i.) bis  $10^{6,75}$  KID<sub>50</sub> / ml (72 h p.i.). Ein leichter Titeranstieg konnte lediglich nach Zugabe von DCU 72 h p.i. gefunden werden (Tabelle 4-3). Die cytopathogenen Eigenschaften des Virus wurden durch die Inhibitoren nicht beeinflusst (nicht gezeigt).



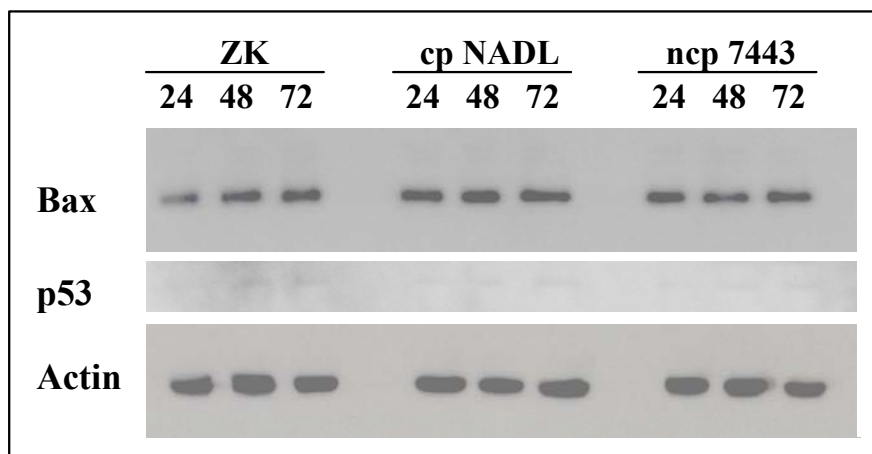
**Abb. 4-6:** Nachweis von BVD-Virusantigen 72 h p.i. in Abhängigkeit von der Zugabe von DCU, Cylo A bzw. Ub<sub>5</sub>. Die Zellen sind unabhängig von der Substanz zu 100 % mit BVD-Virus infiziert (Phasenkontrast, Vergrößerung: 142 x).

	Virustiter KID <sub>50</sub> / ml		
	24 h p.i.	48 h p.i.	72 h p.i.
cp BVDV NADL	10 <sup>5,75</sup>	10 <sup>6,5</sup>	10 <sup>6,5</sup>
cp BVDV NADL + DMSO	10 <sup>5,75</sup>	10 <sup>7,0</sup>	10 <sup>6,25</sup>
cp BVDV NADL + DCU	10 <sup>5,0</sup>	10 <sup>6,0</sup>	10 <sup>7,25</sup>
cp BVDV NADL + Cyclo A	10 <sup>5,25</sup>	10 <sup>6,5</sup>	10 <sup>6,75</sup>
cp BVDV NADL + Ub <sub>5</sub>	10 <sup>5,5</sup>	10 <sup>6,5</sup>	10 <sup>6,25</sup>

**Tabelle 4-3:** Bestimmung des Virustiters in Abhängigkeit von der Zugabe von DCU, Cyclo A bzw. Ub<sub>5</sub>. Keine der drei getesteten Substanzen wirkte sich signifikant auf den Virustiter aus.

#### 4.2.3 Funktion des proapoptotischen Bax im Verlauf der BVD-Virusinfektion

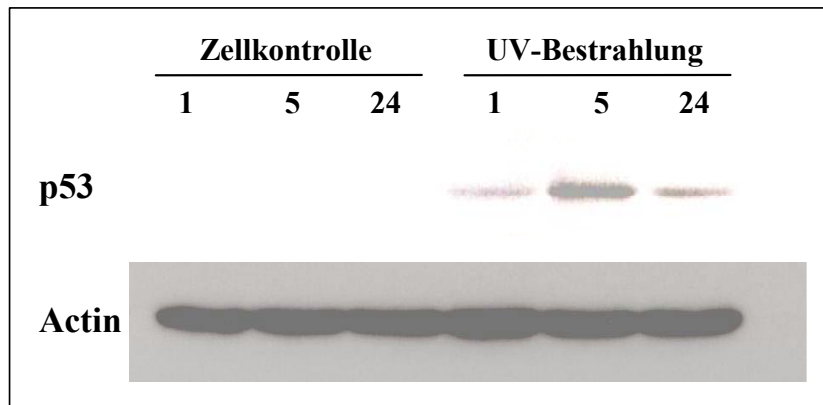
Das proapoptotisch wirkende Protein Bax verfügt über eine Porenbildungsaktivität und ist ein potentieller, jedoch nicht zwingender Bestandteil der PTP im Verlauf der Apoptosekaskade (WOLTER et al., 1997; REED et al., 1998a; SCHENDEL et al., 1998). Um eine mögliche Beteiligung an der Porenbildung zu analysieren, wurde seine Expression in FKN-Zellen im Verlauf der Infektion mit cp und ncp BVD-Virus verfolgt (Abb. 4-7). Zusätzlich wurde die Expression des Bax-Transaktivators p53 untersucht.



**Abb. 4-7:** Untersuchung der Bax- und p53-Expression im Verlauf der Infektion mit BVD-Virus. 24, 48 und 72 h p.i. wurden Zelllysate nicht infizierter und mit BVD-Virus infizierter Zellen erzeugt und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Expression von Bax und p53 wurde mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen. Sie zeigte sich im Verlauf der Infektion unverändert. Als Kontrolle für die Verwendung vergleichbarer Proteinkonzentrationen wurde zusätzlich Actin nachgewiesen.

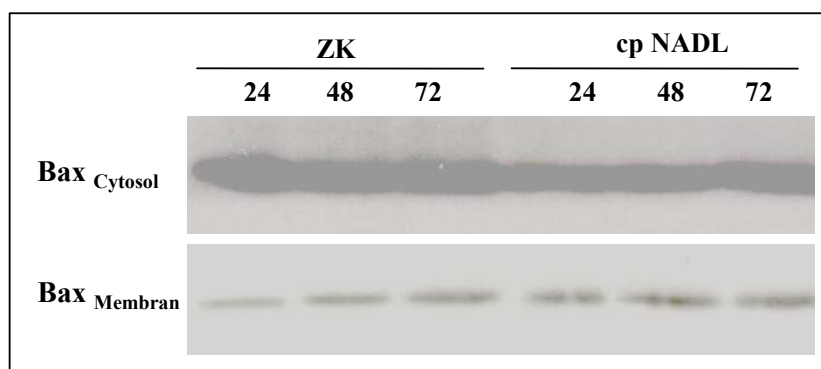
Weder die Infektion mit dem cp noch die mit dem ncp Biotyp führten zu einer Veränderung der Bax-Expression. Auch die Expression des p53-Proteins, welches als positiver Regulator der Bax-Expression gilt, war unverändert. Da das p53 in FKN-Zellen nur sehr schwach exprimiert wurde, wurde versucht, die Expression durch Stimulation von

außen zu initiieren. Hierfür wurden FKN-Zellen für 30 sec mit UV-Strahlung behandelt und die p53-Expression nach 1, 5 und 24 h analysiert (Abb. 4-8). Im Gegensatz zur BVD-Virusinfektion konnte die p53-Expression durch UV-Strahlung deutlich gesteigert werden, wie bereits 1 h nach Induktion sichtbar wurde. Demzufolge konnte eine p53-Überexpression und eine daran gekoppelte Änderung der Bax-Expression als Folge der BVD-Virusinfektion ausgeschlossen werden.



**Abb. 4-8:** Nachweis der p53-Aktivierung in FKN-Zellen nach UV-Bestrahlung. FKN-Zellen wurden für 30 sec UV-bestrahlt. Nach 1, 5 und 24 h wurden Zelllysate hergestellt, elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend das p53 sowie das Actin detektiert. Die Bestrahlung mit UV führte in FKN-Zellen zu einer signifikanten p53-Überexpression.

Eine weitere Möglichkeit der Beteiligung des Bax-Proteins im Verlauf der PTP-Öffnung ist die Translokation vom Cytosol in die Mitochondrien, ohne dass dies zu einer nachweisbaren Überexpression führt. Um diesen Aspekt näher zu untersuchen, wurden FKN-Zellen mit dem cp BVD-Virus NADL infiziert und nach 24, 48 und 72 h p.i. Zellfraktionierungen durchgeführt. Nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE erfolgte der Nachweis in der Cytosolfraktion und in der Membranfraktion mit Hilfe spezifischer Antikörper (Abb. 4-9).

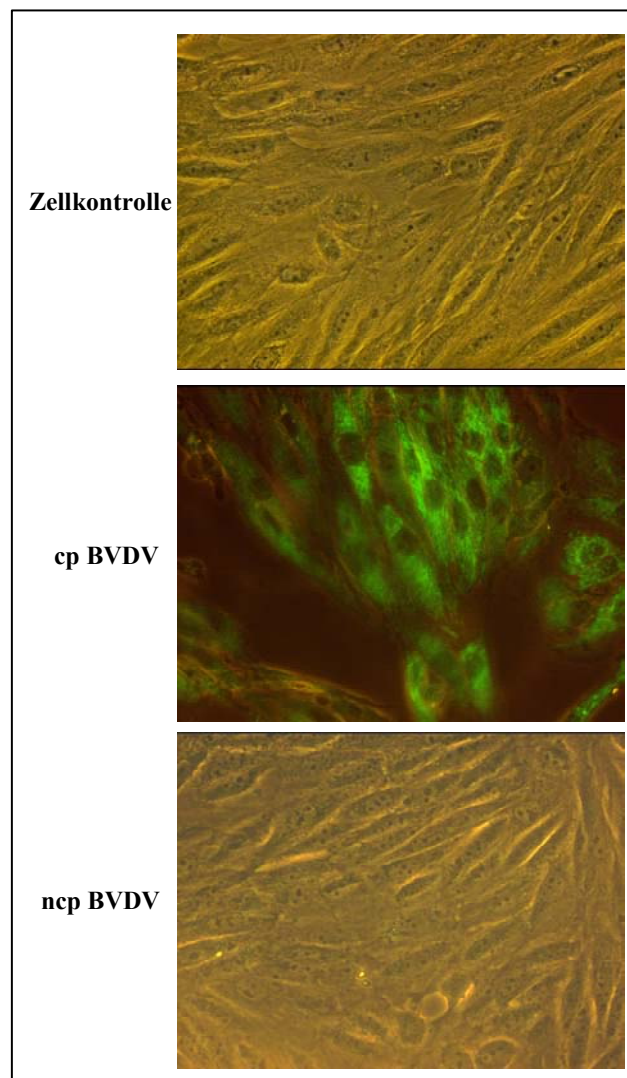


**Abb. 4-9:** Untersuchung der Bax-Lokalisation im Verlauf der Infektion mit cp BVD-Virus. 24, 48 und 72 h p.i. wurden die Cytosol- und die Membranfraktion infizierter und nicht infizierter Zellen gewonnen, elektrophoretisch aufgetrennt, und Bax über spezifische Antikörper gefärbt. Bax verblieb vornehmlich in der Cytosolfraktion.

Eine Bax-Translokation in mit cp BVD-Virus infizierten Zellen konnte nicht nachgewiesen werden. Der größte Anteil verblieb während des Infektionsverlaufs im Cytosol. Lediglich ein Bruchteil lag membranassoziiert vor.

#### 4.2.4 Funktion des *second messengers* Calcium

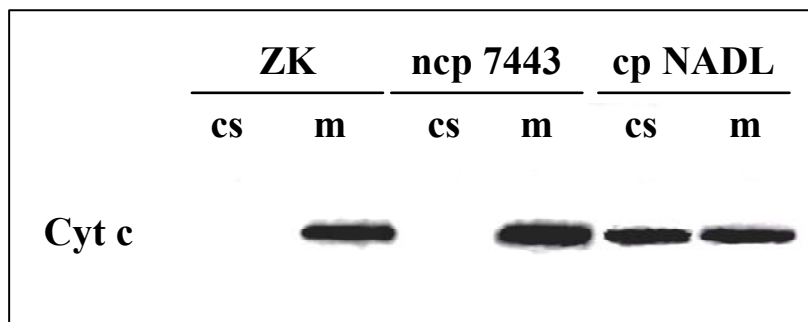
Um einen Einblick in den Calciumstoffwechsel im Verlauf der BVD-Virusinfektion zu erhalten, wurden FKN-Zellen mit cp NADL bzw. ncp 7443 mit einer MOI = 1 infiziert, und die Konzentration des freien Calciums 24 h p.i. mit Hilfe des zellpermeablen Calcium-Markers CG-2 am Fluoreszenzmikroskop bestimmt (Abb. 4-10). Während die Infektion mit dem ncp Biotyp nicht zur Freisetzung von Calcium-Ionen aus dem ER und den Mitochondrien führte, war in den mit cp BVD-Virus infizierten Zellen bereits 24 h p.i. freies Calcium nachweisbar.



**Abb. 4-10:** Darstellung des freien Calciums in mit BVD-Virus infizierten Zellen durch Färbung mit CG-2. Freies Calcium lag lediglich in Zellen vor, die mit cp BVD-Virus infiziert waren. (Phasenkontrast mit überlagelter Fluoreszenz; Vergrößerung 282 x)

### 4.2.5 Bildung des Apoptosoms

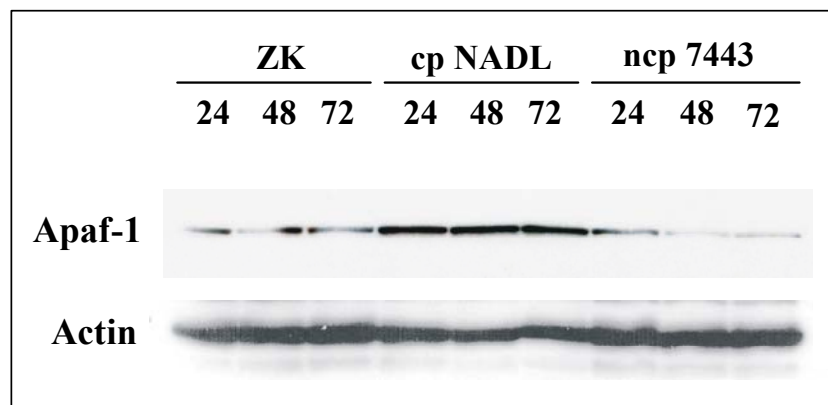
Die temporäre Komplexierung von Cyt c, Apaf-1 und der Pro-Caspase-9 im Cytoplasma zum Apoptosom stellt ein Schlüsselereignis der Apoptoseinduktion über den „*intrinsic pathway*“ dar (CHINNAIYAN, 1999). Sie resultiert in der Aktivierung der Caspase-9 als Initiatorcaspase und damit zur Initiation der Caspasenkaskade. Hierfür ist es zwingend erforderlich, dass Cyt c aus den Mitochondrien ins Cytoplasma der Zelle freigesetzt wird. Um die mögliche Cyt c-Translokation in BVD-virusinfizierten Zellen verfolgen zu können, wurden infizierte und nicht infizierte FKN-Zellen 24 und 48 h p.i. lysiert und mittels Ultrazentrifugation in eine Membran- und eine Cytosolfraktion fraktioniert. Die Proteine der Fraktionen wurden über eine SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Lokalisation des Cyt c in BVD-virusinfizierten Zellen ist in Abb. 4-11 dargestellt. 24 h p.i. konnten noch keinerlei Unterschiede in der Cyt c-Verteilung zwischen Kontroll- und infizierten Zellen festgestellt werden. Das Cyt c war lediglich in der Membranfraktion nachweisbar (nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu war Cyt c 48 h p.i. in Zellen, die mit dem cp Biotyp infiziert waren, sowohl in der Membran- als auch in der Cytosolfraktion lokalisiert. Die Translokation erfolgte jedoch nicht in den mit ncp BVD-Virus infizierten Zellen.



**Abb. 4-11:** Lokalisation des Cytochrom c im Verlauf der Infektion mit BVD-Virus. 48 h p.i. wurden infizierte und nicht infizierte Zellen in die Cytosolfraktion (**cs**) sowie die Membranfraktion (**m**) fraktioniert, elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend Cyt c mittels Immunoblot nachgewiesen. Die Infektion mit cp BVD-Virus führte zu einer Freisetzung des Cyt c aus den Mitochondrien ins Cytosol.

Apaf-1 ist als zweiter Bestandteil des Apoptosoms lediglich im Cytosol lokalisiert. Eine mögliche Veränderung der Apaf-1-Expression infolge der Infektion mit BVD-Virus könnte einen weiteren Hinweis für die Bildung des Apoptosoms geben. Hierfür wurde erneut die Cytosolfraktion infizierter und nicht infizierter Zellen nach 24, 48 und 72 h p.i. gewonnen, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Apaf-1-Expression über eine spezifische Immunfärbung nachgewiesen. Um zu gewährleisten, dass gleiche Proteinkonzentrationen aufgetragen wurden, wurde im Anschluss das Cytoskelettprotein Actin ebenfalls über Immunfärbung nachgewiesen (Abb. 4-12).

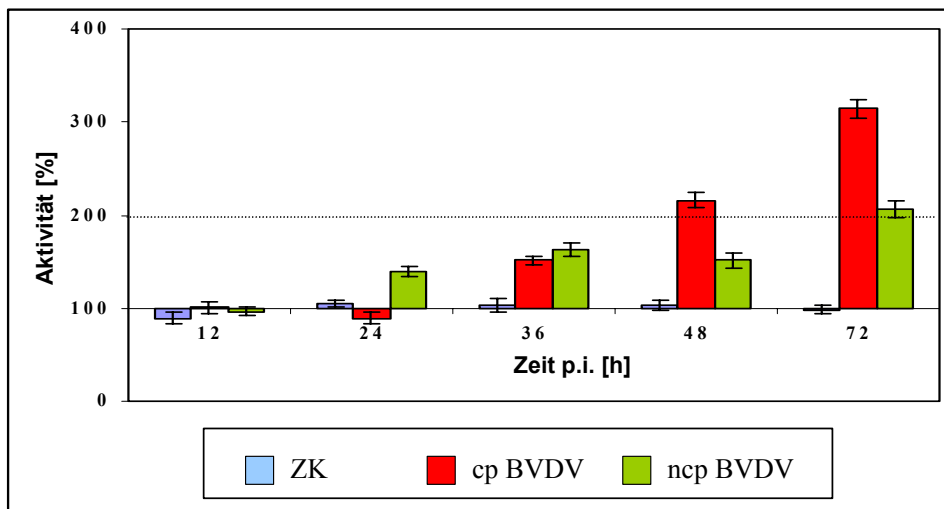




**Abb. 4-12:** Untersuchung der Apaf-1-Expression im Cytosol BVD-virusinfizierter Zellen. 24, 48 und 72 h p.i. wurde das im Cytosol lokalisierte Protein nach Aufreinigung der Cytosolfraction mittels SDS-PAGE und Immunoblot mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Die Infektion mit cp BVD-Virus führte zu einer gesteigerten Apaf-1-Expression in bovinen Zellen.

Apaf-1 wurde sowohl in den Kontrollzellen als auch in mit ncp BVD-Virus infizierten Zellen kontinuierlich auf einem vergleichbaren niedrigen Niveau exprimiert. Dagegen führte die Infektion mit dem cp Biotyp bereits 24 h p.i. zu einer vermehrten Apaf-1-Expression.

Die dritte Komponente des Apoptosoms, die Pro-Caspase-9 wird infolge der temporären Bildung des Apoptosoms in das aktive Enzym Caspase-9 prozessiert. Diese Aktivierung konnte in Ermangelung kreuzreaktiver Antikörper nur indirekt über einen Enzymtest durchgeführt werden (Abb. 4-13). Eine Aktivierung der Caspase-9 konnte in Zellen, die mit cp BVD-Virus infiziert waren, nach 48 h p.i. gemessen werden. Die Werte erreichten nach 72 h p.i. ein Maximum von mehr als 300 % gegenüber der nicht infizierten Kultur. Auch in den mit dem ncp Biotyp infizierten Zellen konnte nach 72 h p.i. ein leichter Anstieg der Caspase-9-Aktivität verzeichnet werden. Die Werte erreichten jedoch keinen ähnlich signifikanten Level wie in den mit dem cp Biotyp infizierten Zellkulturen.

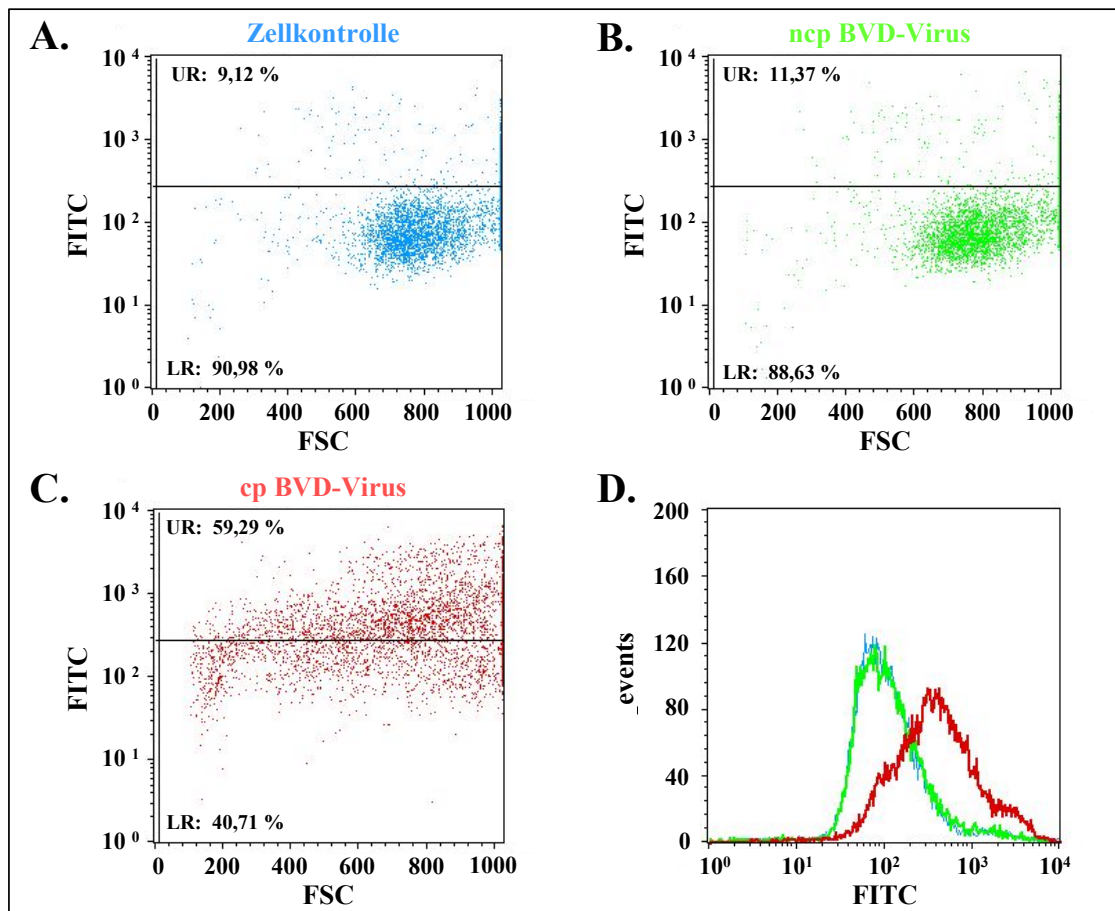


**Abb. 4-13:** Colorimetrischer Nachweis der Caspase-9-Aktivität in nicht infizierten Zellen (blau) in mit cp BVD-virusinfizierten Zellen (rot) und in mit ncp BVD-Virus infizierten Zellen (grün). Das Niveau der Enzymaktivität ist direkt proportional zur Freisetzung des Farbstoffs. Ein Anstieg der Aktivität  $\geq 100$  % im Vergleich zur Zellkontrolle wurde gemäß den Herstellerangaben als signifikant erachtet. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte dreier in Doppelansätzen durchgeführter Experimente. 48 h p.i. wurde in Zellen, die mit cp BVDV infiziert waren, eine Aktivierung der Caspase-9 verzeichnet. 72 h p.i. war ein leichter Anstieg der Caspase-9-Aktivität in Zellen nachweisbar, die mit ncp BVD-Virus infiziert waren.

### 4.3 Untersuchung möglicher Inhibitionsstrategien des ncp BVD-Virus

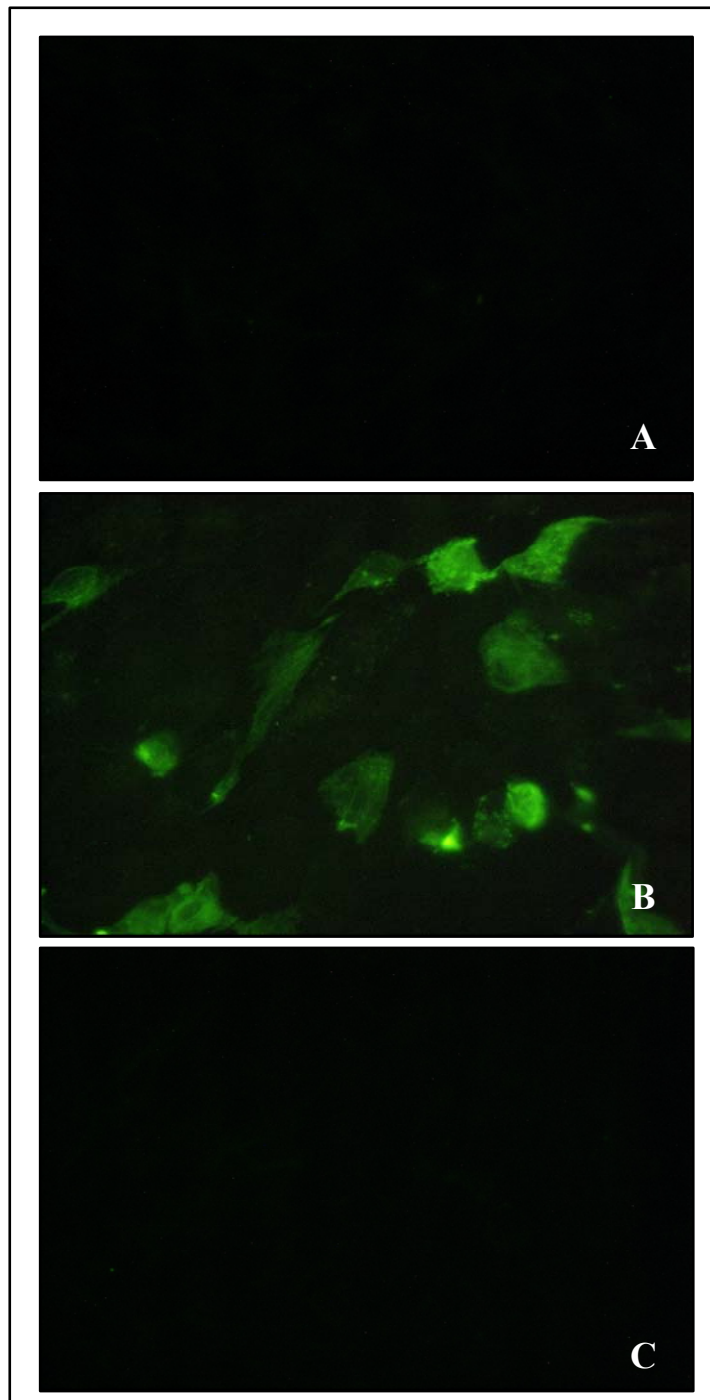
#### 4.3.1 Inhibition auf der exekutiven Ebene

Eine Möglichkeit, den Zelltod durch Apoptose zu unterbrechen und damit eine persistierende Infektion zu gewährleisten, ist die Inhibition der Caspasenkaskade. Um zu prüfen, ob das ncp BVD-Virus diesen Weg nutzt, wurde zunächst untersucht, ob in mit dem ncp Biotyp infizierten Zellen generell eine Aktivierung der Caspasenkaskade detektierbar ist, wie es der colorimetrische Nachweis der Caspase-9-Aktivität vermuten ließ. Hierfür wurde das FITC-konjugierte Peptid FITC-VAD-FMK verwendet. Die Aktivität wurde 72 h p.i. mittels Durchflusszytometrie ermittelt (Abb. 4-14). In den mit ncp BVD-Virus infizierten Zellen konnte keine signifikante Caspasenaktivierung nachgewiesen werden. Die Werte lagen mit 11,37 % im Bereich der nicht infizierten Zellkontrollen. Demgegenüber zeigten 59,29 % der Zellen, die mit cp BVD-Virus infiziert waren, eine Caspasenaktivierung.



**Abb. 4-14:** Nachweis der Caspasenaktivierung mittels Durchflusscytometrie. 72 h p.i. wurden die Zellen mit dem FITC-konjugierten Peptid FITC-VAD-FMK inkubiert und die Caspasenaktivität anschließend in der FACS-Analyse ausgewertet. (A) Darstellung der Caspasenaktivität in nicht infizierten Zellen (blau); (B) in mit ncp BVD-Virus infizierten Zellen (grün); (C) in mit cp BVD-virusinfizierten Zellen (rot). (D) Vergleichende Darstellung. Lediglich in Zellen, die mit cp BVD-Virus infiziert waren, konnte eine Aktivierung der Caspasenkaskade gezeigt werden.

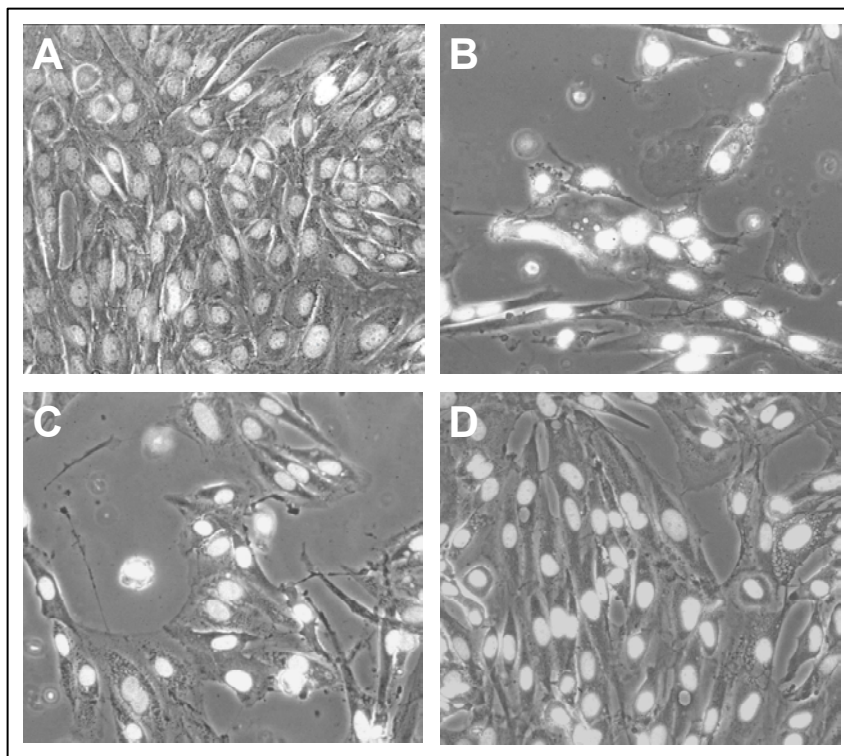
Demgegenüber zeigte sich bereits 16 h p.i. eine erste Caspasenaktivität in den mit cp BVD-Virus infizierten Zellen (Abb. 4-15).



**Abb. 4-15:** Nachweis der Caspasenaktivierung infolge der Infektion mit cp BVD-Virus. 16 h p.i. wurden Zellen mit FITC-VAD-FMK inkubiert, und die Aktivierung im Anschluss am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. (A) Nicht infizierte Zellkontrolle; (B) mit cp BVD-Virus infizierte Zellen; (C) mit ncp BVD-Virus infizierte Zellen (Fluoreszenz; Vergrößerung:455 x).

Da die Caspasenaktivität infolge der Infektion mit dem ncp Biotyp unterblieb, sollte im Folgenden geprüft werden, ob die simultane Inkubation mit dem Inhibitor Z-VAD-FMK in mit dem cp Biotyp infizierten Zellen in einer Apoptoseinhibition resultiert. Hierfür wurden FKN-Zellen mit cp BVD-Virus NADL infiziert und simultan mit dem Inhibitor-

Z-VAD-FMK in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  versetzt. Aufgrund der Instabilität des Peptids wurde der Inhibitor alle 12 h ergänzt. Als Kontrollen dienten mit Dimethylsulfoxid (DMSO) behandelte infizierte Zellen. Der Effekt des Caspaseninhibitors auf die Zellkultur und die Ausprägung des virusbedingten CPE wurde alle 24 h mikroskopisch begutachtet. Die Zellkerne wurden zusätzlich mit DAPI gefärbt. In Abb. 4-16 sind die Kulturen 48 h p.i. dargestellt.

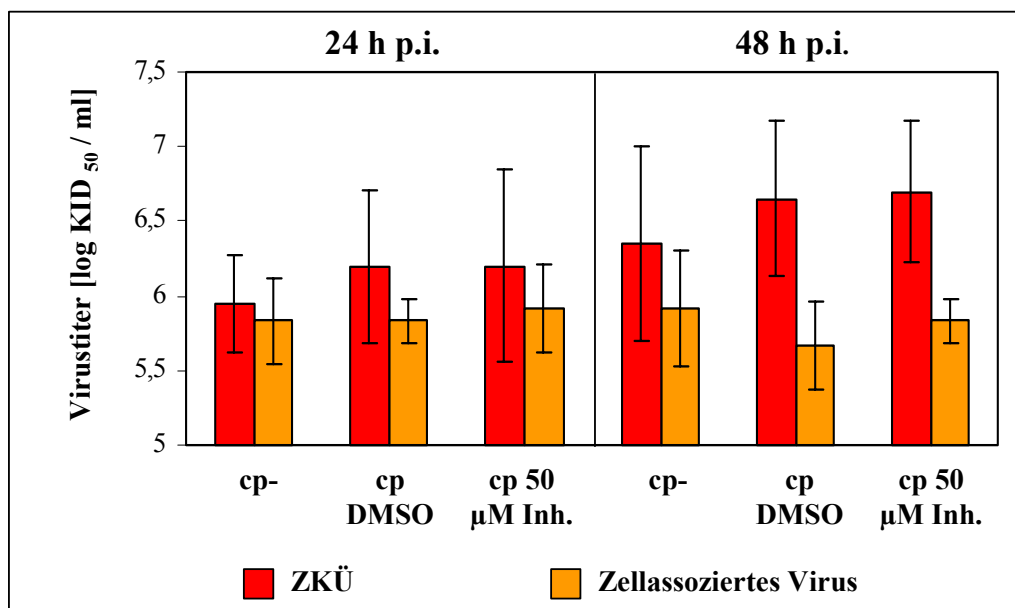


**Abb. 4-16:** Wirkung des Caspaseninhibitors Z-VAD-FMK auf cp BVD-virusinfizierte Zellen 48 h p.i.. FKN-Zellen wurden mit 50  $\mu\text{M}$  Z-VAD-FMK inkubiert. Die Wirkung wurde mikroskopisch begutachtet. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. (A) nicht infizierte Zellkontrolle, (B) cp BVD-virusinfizierte Zellen ohne Z-VAD-FMK, (C) cp BVD-virusinfizierte Zellen mit DMSO, (D) cp BVD-virusinfizierte Zellen mit 50  $\mu\text{M}$  Z-VAD-FMK. Die Inkubation mit Z-VAD-FMK verzögerte das Auftreten eines CPE. (Phasenkontrast mit überlagerter Fluoreszenz; Vergrößerung: 238 x)

Zellen, die mit DMSO inkubiert wurden, zeigten ebenso wie die unbehandelten Zellen bereits nach 24 h p.i. einen deutlichen CPE, gekennzeichnet durch Vakuolisierung und Abkuglung von Zellen aus dem Zellverband. Demgegenüber war in solchen Zellen, die mit dem Inhibitor Z-VAD-FMK inkubiert wurden, ein geschlossener Zellrasen zu beobachten, der sich von der Zellkontrolle nur geringfügig unterschied. Vereinzelt war der Beginn eines CPE sichtbar. Nach 48 h p.i. war der CPE in der Viruskontrolle bereits weit fortgeschritten, der Zellrasen war zu 50 – 60 % zerstört. Das Bild in den mit Z-VAD-FMK behandelten Zellen entsprach nach 48 h p.i. dem der Positivkontrolle vom Vortag. Die Zellen begannen Vakuolen auszubilden. Es kam zu einer Abkuglung und einem Herauslösen aus dem Zellverband. Der Zellrasen war zu ca. 10 % zerstört. Der Caspase-Inhibitor verzögerte demnach das Auftreten des CPE, konnte ihn jedoch nicht

vollständig unterbinden, denn 72 h p.i. war der CPE bereits deutlich fortgeschritten und entsprach in etwa der Positivkontrolle. Auch höhere Konzentrationen (75, 100  $\mu\text{M}$ ) veränderten den Effekt nicht (Daten nicht gezeigt). Konzentration über 100  $\mu\text{M}$  waren cytotoxisch.

Um die Möglichkeit des Einflusses des Caspaseninhibitors auf die Virusreplikation und /oder Virusfreisetzung ausschließen zu können, wurden FKN-Zellen mit cp BVD-Virus NADL (MOI = 1) infiziert und Z-VAD-FMK simultan hinzugefügt und alle 12 h ergänzt. Nach 24 und 48 h p.i. wurde freies und zellassoziertes BVD-Virus geerntet und der Virustiter bestimmt (Abb. 4-17). Außerdem wurden mit dem ZKÜ neue Zellkulturen infiziert, um zu prüfen, ob die Nachkommenviren ebenfalls cytopathogen sind.



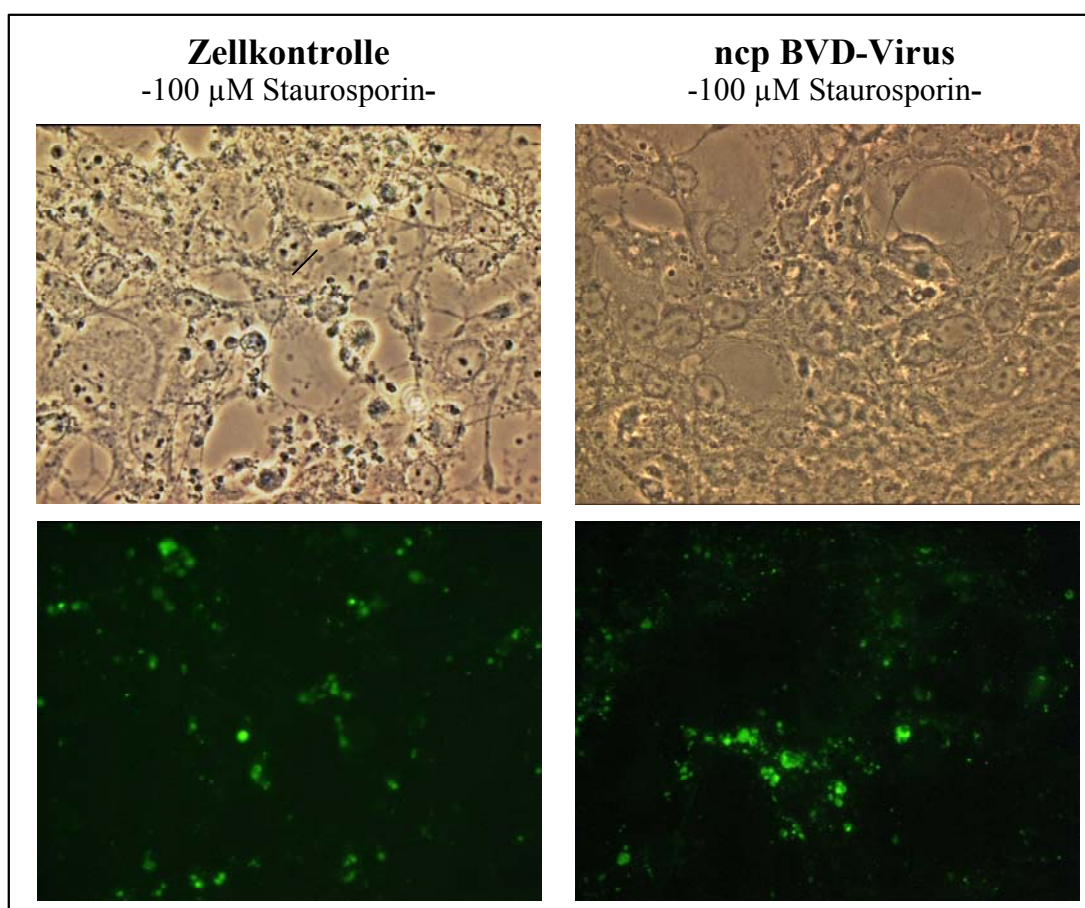
**Abb. 4-17:** Ermittlung des Virustiters in Abhängigkeit von Z-VAD-FMK. Mit cp BVD-Virus infizierte FKN-Zellen wurden mit 50  $\mu\text{M}$  Z-VAD-FMK inkubiert. 24 und 48 h p.i. wurde der Zellkulturüberstand (rot) infizierter Zellen sowie zellassoziertes Virus (orange) gewonnen und der Virustiter ermittelt. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte dreier im Doppelansatz durchgeführter Experimente. Die Zugabe des Inhibitors hatte keinerlei Auswirkungen auf die Virusreplikation und Virusfreisetzung.

Der Virustiter in mit Z-VAD-FMK inkubierten Zellen unterschied sich nicht signifikant von der unbehandelten und der mit DMSO behandelten Kontrolle. 24 h p.i. betragen die Titer im Zellkulturüberstand ca.  $10^6$  KID<sub>50</sub>/ml. Die Titer für zellgebundenes Virus lagen etwas darunter. 48 h p.i. erhöhten sich die Virustiter im ZKÜ um eine halbe Titerstufe. Interessanterweise war der Titer in der unbehandelten Kontrolle im ZKÜ stets niedriger als in den Ansätzen, die DMSO enthielten. Der Virusgehalt in den Zellen war 48 h p.i. geringer, lag jedoch mit einer Vierteltiterstufe nicht signifikant unter den Kontrollwerten. Dementsprechend hatte die Zugabe des Inhibitors Z-VAD-FMK keinerlei Auswirkungen auf die Virusreplikation und die Freisetzung. Die Nachkommenviren waren ebenfalls wieder cytopathogen, so dass eine Änderung der cytopatho-

genen Eigenschaften des cp Biotyps infolge der Inkubation mit dem Inhibitor ausgeschlossen werden konnte.

#### 4.3.2 Wirkung von Staurosporin auf die Infektion mit ncp BVD-Virus

Um eine mögliche Inhibition der Caspasenkaskade durch den ncp Biotyp vollständig ausschließen zu können, sollte die Wirkung des Apoptoseinduktors Staurosporin auf eine mit ncp BVD-Virus infizierte Zellkultur untersucht werden. Staurosporin führt zur Induktion der Caspasenkaskade (MIRKES und LITTLE, 2000). Hierfür wurden FKN-Zellen mit ncp BVD-Virus infiziert und für 48 h inkubiert, bevor Staurosporin hinzugefügt wurde. Eine simultane Zugabe wurde nicht erwogen, da die Synthese viraler Proteine für die Viruspersistenz von zwingender Bedeutung ist. Der Nachweis der Aktivierung der Caspasen erfolgte erneut über den FITC-konjugierten Marker FITC-VAD-FMK und wurde 72 h p.i. am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet (Abb. 4-18).

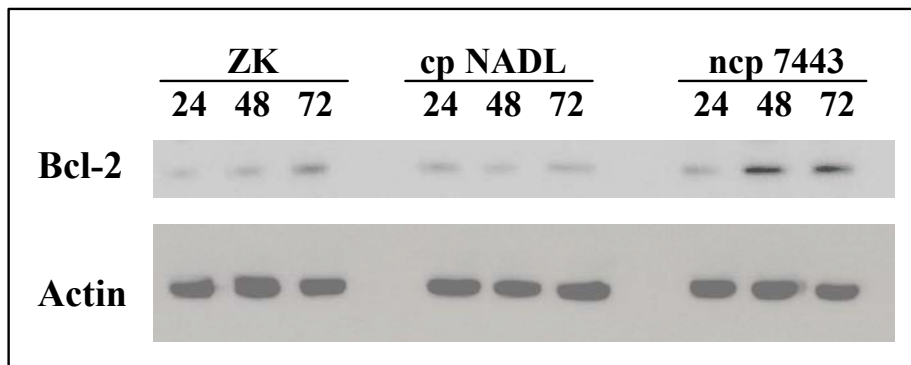


**Abb. 4-18:** Wirkung von Staurosporin auf die Infektion mit ncp BVD-Virus. 48 h p.i. wurden nicht infizierte und mit ncp BVD-Virus infizierte Zellen mit 100 µM Staurosporin versetzt und für weitere 24 h inkubiert. Anschließend wurde die Auswirkung auf die Caspasenkaskade unter Verwendung von FITC-VAD-FMK im Mikroskop bewertet. Die Infektion mit ncp BVD-Virus konnte die Zellen nicht vor der Apoptoseinduktion durch Staurosporin schützen. (Phasenkontrast und Fluoreszenz; Vergrößerung: 238 x).

Die Zugabe von Staurosporin induzierte sowohl in nicht infizierten als auch in mit ncp BVD-Virus infizierten Zellen caspasenabhängige Apoptose. Demzufolge konnte eine ncp BVD-virusbedingte Inhibition der Caspasenkaskade ausgeschlossen werden.

### 4.3.3 Inhibition auf regulatorischer Ebene

Als ein weiteres potentiell Ziel der Apoptoseinhibition durch das ncp BVD-Virus wurde die Expression des antiapoptotisch wirkenden Bcl-2-Proteins näher untersucht. Hierfür wurden FKN-Zellen mit cp bzw. ncp BVD-Virus infiziert und die Expression nach 24, 48 und 72 h p.i. im Immunoblot mit polyklonalen Antikörpern untersucht (Abb. 4-19).



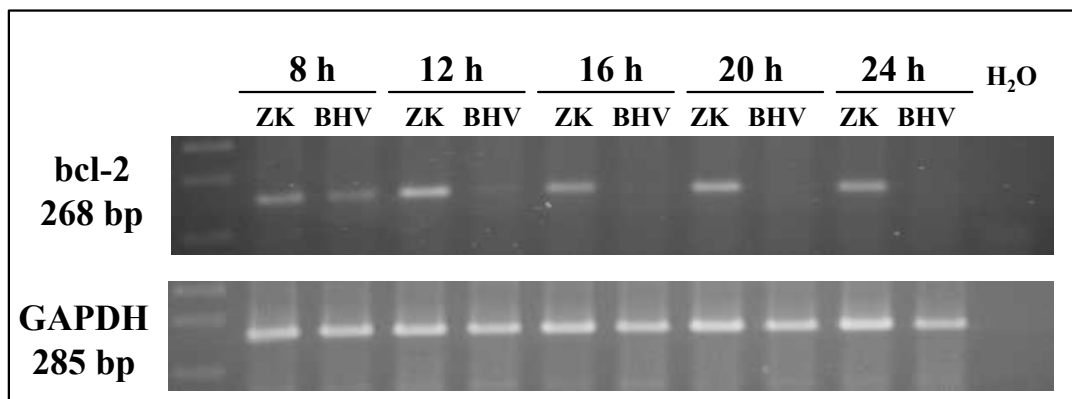
**Abb. 4-19:** Untersuchung der Bcl-2-Expression im Verlauf der Infektion mit BVD-Virus. 24, 48 und 72 h p.i. wurden Zelllysate nicht infizierter und mit BVD-Virus infizierter Zellen erzeugt und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Bcl-2-Expression wurde mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen. In Zellen, die mit ncp BVD-Virus infiziert waren, konnte eine gesteigerte Bcl-2-Expression 48 h p.i. nachgewiesen werden. Als Kontrolle für die Verwendung vergleichbarer Proteinkonzentrationen wurde zusätzlich Actin nachgewiesen.

Während die Expression infolge der Infektion mit cp BVD-Virus keine Unterschiede im Vergleich zur Zellkontrolle aufwies, konnte in den Zellen, die mit ncp BVD-Virus infiziert waren, ein deutlicher Anstieg der Bcl-2-Expression verzeichnet werden.

### 4.3.4 Untersuchung der bcl-2-mRNA

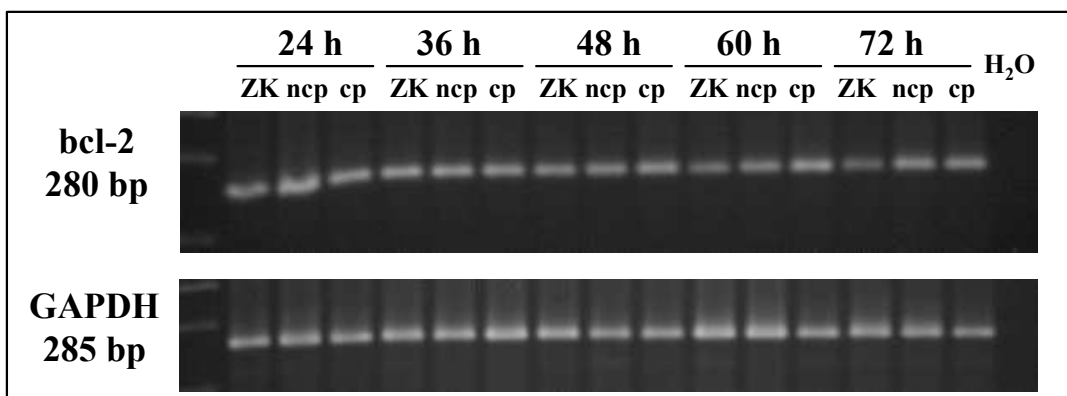
Die Infektion von Zellen mit BHV-1 resultiert in einer Apoptoseinduktion und beeinträchtigt die Bcl-2-Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene signifikant (DEVIREDDY und JONES, 1999). Um zu prüfen, ob die Bcl-2-Expression im Verlauf der BVD-Virusinfektion auf mRNA-Ebene beeinflusst wird, wurde die RNA aus infizierten Zellen extrahiert und dem Protokoll von Devireddy entsprechend eine PCR zum Nachweis von bcl-2-RNA durchgeführt. Um zu gewährleisten, dass gleiche RNA-Konzentrationen verwendet wurden, wurde in einer zweiten PCR ein Fragment der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) amplifiziert (Abb. 4-21). Die Versuche wurden zusätzlich mit BHV-1-infizierten Zellen durchgeführt (Abb. 4-20).





**Abb. 4-20:** PCR zum Nachweis von *bcl-2*-mRNA in BHV-1-infizierten PT-Zellen. 8, 12, 16, 20 und 24 h p.i. wurden infizierte sowie nicht infizierte Zellen lysiert und anschließend die RNA isoliert. 3 µg der RNA wurden in einer RT-PCR zum spezifischen Nachweis der *bcl-2*-mRNA eingesetzt. Die Infektion mit BHV-1 führte bereits 12 h p.i. zu einer deutlichen *bcl-2*-mRNA-Abnahme.

Wie erwartet führte die Infektion mit BHV-1 Colorado bereits nach 12 h p.i. zu einer deutlichen Abnahme der *bcl-2*-mRNA, während das Enzym GAPDH davon unbeeinträchtigt blieb. 20 h p.i. war keine spezifische RNA mehr nachweisbar.



**Abb. 4-21:** PCR zum Nachweis von *bcl-2*-RNA in BVD-virusinfizierten PT-Zellen. 24, 36, 48, 60 und 72 h p.i. wurden infizierte sowie nicht infizierte Zellen lysiert und anschließend die RNA isoliert. 3 µg der RNA wurden in einer RT-PCR zum spezifischen Nachweis der *bcl-2*-mRNA eingesetzt. Weder die Infektion mit cp noch mit ncp BVD-Virus führte zu einer Veränderung des *bcl-2*-mRNA-Niveaus.

Im Gegensatz dazu war das *bcl-2*-RNA-Niveau von einer Infektion mit BVD-Virus, unabhängig vom Biotyp, unbeeinflusst.

#### 4.3.5 Stabile konstitutive Bcl-2-Expression in PT-Zellen

Zur Prüfung der Wirkung des Bcl-2 wurde das korrespondierende Gen aus bovinen Zellen gewonnen, mittels RT-PCR amplifiziert und in einen geeigneten Expressionsvektor kloniert, um später in einer eukaryotischen Zellkultur überexprimiert werden zu können. Da die Amplifikation trotz bekannter Gensequenzen nicht möglich war, wurde eine abweichende Strategie verfolgt. Anstelle des bovines Gens wurde das murine

Homolog verwendet, welches als Vektorsystem kommerziell erhältlich war. Zuvor wurde ein Sequenzvergleich durchgeführt, um sicherzustellen, dass die Proteine der Spezies Rind und Maus insbesondere in den relevanten BH-Domänen nicht differieren (Abb. 4-22).

Das bovine Bcl-2-Protein ist mit 229 aa etwas kürzer als seine humanen bzw. murinen Homologe (239 aa / 236 aa). Der N-terminale Bereich scheint nur bedingt konserviert zu sein. Die für die regulatorische Aktivität des Proteins bedeutsamen Domänen BH1 bis BH4 sind hiervon jedoch unbeeinflusst. Diese Bereiche sind innerhalb der verglichenen Spezies identisch. Aufgrund dessen konnte davon ausgegangen werden, dass die Expression des murinen Bcl-2 in bovinen Zellen dieselben Effekte zeigen müsste wie das bovine Protein.

		Referenzmolekül:	Mensch	239 aa	Homologie
		Sequenz 2:	Rind	229 aa	90%
		Sequenz 3:	Maus	236 aa	90%
<b>BH4</b>					
<b>Mensch</b>	( 1)	MAHAGRTGY	<b>DNREIVMKYIHYKLSQ</b>	<b>RGYEW</b>	DAGDVGAAPPGAAPAGIFS
<b>Rind</b>	( 1)	.....G.....	.....	.....	.....A.....L.
<b>Maus</b>	( 1)	..Q.....	.....	.....	.....AD...L...T.....
<b>BH3</b>					
<b>Mensch</b>	( 51)	SQPGHTPHTAASRDPVARTSPLQTPAAPGAAAGPALSPVPP	<b>VVHLTLRQA</b>		
<b>Rind</b>	( 51)	....R...P.....	.....	.....	.....PP.A.....P.....
<b>Maus</b>	( 51)	F..ESN.MP.VH..MA.....	---	RPLV.T.....	.....R.
<b>BH1</b>					
<b>Mensch</b>	( 101)	<b>GDDFSRRYRRDFAEMSRQLHLTPFTARGRFAT</b>	<b>VVEELFRDGVNWGRIVAF</b>		
<b>Rind</b>	( 91)	.....	S.....	E.....	.....
<b>Maus</b>	( 98)	.....	S.....	.....	.....
<b>BH2</b>					
<b>Mensch</b>	( 151)	<b>FEFGGVMCVESVNREMSPLVDNIALWMTEYLNRLHL</b>	<b>TWIQDNGGWDAFVE</b>		
<b>Rind</b>	( 141)	.....	S.....	.....	.....
<b>Maus</b>	( 148)	.....	.....	.....	.....
<b>Mensch</b>	( 201)	<b>LYGPSMRPLFDFSWLSLKTLLSLALVGACITLGAYLGHK</b>			
<b>Rind</b>	( 191)	.....	A.....	.....	.....
<b>Maus</b>	( 198)	.....	.....	.....	.....

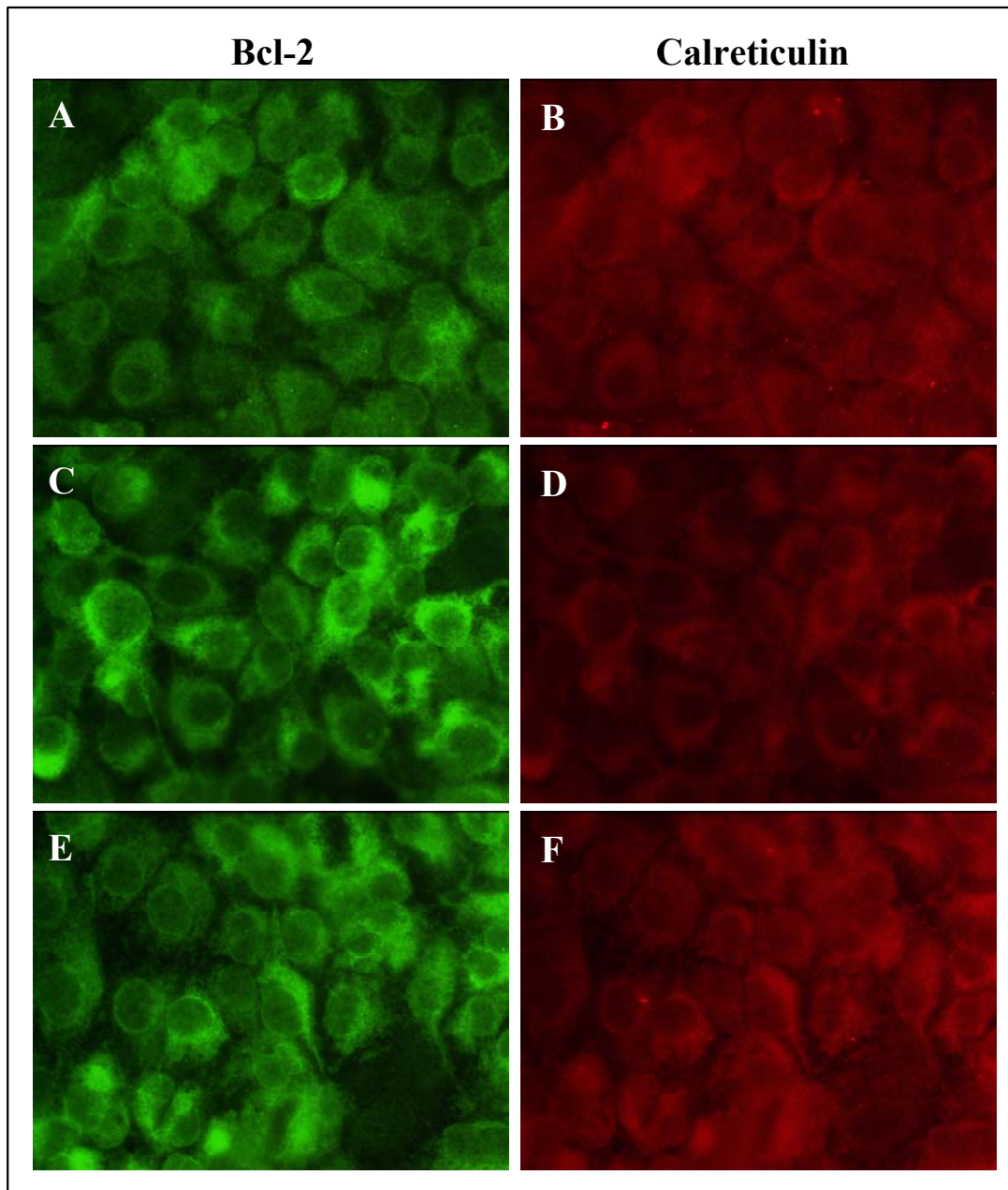
**Abb. 4-22:** Aminosäuresequenzvergleich des Bcl-2-Proteins verschiedener Spezies. Die konservierten BH-Domänen sind **rot** unterlegt. Die Homologie im Vergleich zum humanen Referenzmolekül beläuft sich auf 90 %. Die BH-Domänen sind jedoch unverändert.

Um für die spätere stabile Expression das geeignete Vektorsystem zur Verfügung zu haben, wurde das murine bcl-2-Gen aus dem Vektor pB2 herausgeschnitten und in den Vektor pcDNA 3.1 Zeo+ einkloniert. Mit diesem Konstrukt pcB2 wurden PT-Zellen mittels Calcium-Phosphat-Methode transfiziert. Durch Zeocin-Zugabe wurde eine stabile konstitutive Expression erreicht. Für die weiteren Versuche wurden drei Klone (2B3, 4F7, 5F4) ausgewählt. Sie zeigten bei unveränderter Zellmorphologie auch nach Monaten eine stabile Überexpression des murinen Bcl-2. Die Klone waren auch weiter-

hin für das BVD-Virus permissiv und führten zu vergleichbaren Virustitern wie die nicht transfizierten PT-Zellen.

#### **4.3.6 Lokalisation des murinen Bcl-2 in PT-Zellen**

Bevor die mögliche inhibitorische Wirkung des überexprimierten Bcl-2 auf die Ausprägung des cp BVD-virusinduzierten CPE untersucht werden konnte, sollte geprüft werden, ob das rekombinante Protein ebenfalls mit den Membranstrukturen des ER, der Mitochondrien und des Zellkerns assoziiert ist. Hierfür wurde in einer doppelten Immunfluoreszenzfärbung (DIF) neben dem Bcl-2 auch das zelluläre Protein Calreticulin angefärbt. Es ist in die Membranen des ER integriert und spielt zusammen mit Calnexin bei der Glykosylierung von Proteinen am ER eine Rolle (WADA et al., 1995). In Abb. 4-23 ist die Lokalisation des rekombinanten Bcl-2 in den drei Klonen dargestellt.

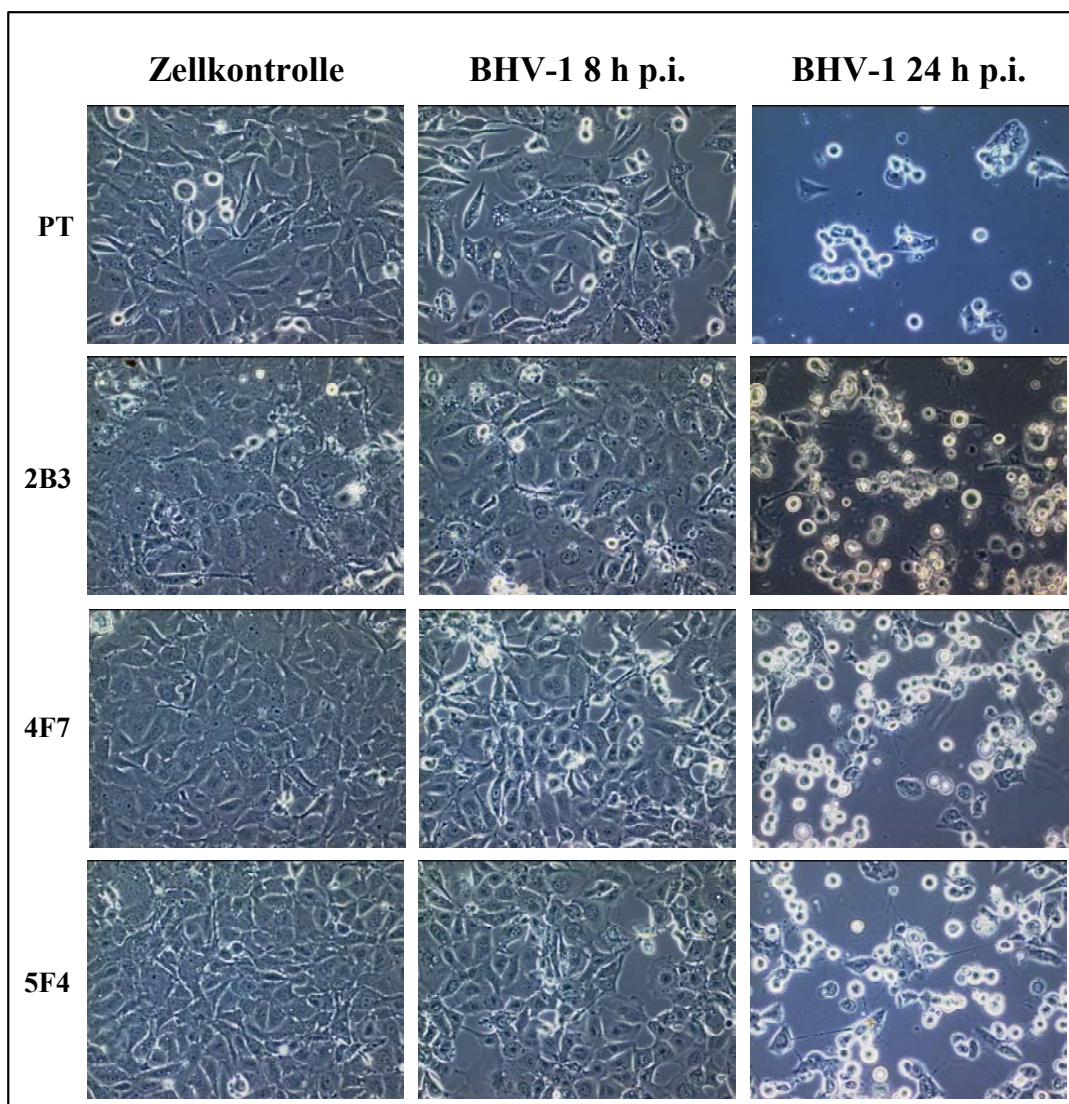


**Abb. 4-23:** Nachweis der Bcl-2-Lokalisation mittels doppelter Immunfluoreszenz. Vergleichende Darstellung des rekombinanten Bcl-2-Proteins mit dem ER-assoziierten Calreticulin. (A, B) Klon 2B3; (C, D) Klon 4F7; (E, F) Klon 5F4 (Floureszenz; Vergrößerung 480 x)

Das rekombinante Bcl-2 zeigte in allen drei Klonen eine vergleichbare Lokalisation. Neben dem ER waren auch die Kernmembranen gefärbt. Ein Nachweis des bovinen Bcl-2-Proteins mittels DIF in nicht-transfizierten PT-Zellen war aufgrund der geringen Expression nicht möglich.

#### 4.3.7 Wirkung der BHV-1-Infektion auf Bcl-2-überexprimierende Zellen

Da die Bcl-2-Expression durch eine Infektion mit BHV-1 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene signifikant beeinträchtigt wird, sollte im Folgenden die Auswirkung einer Überexpression des Bcl-2-Proteins untersucht werden. Hierfür wurde der Infektionsverlauf in den Zellen 2B3, 4F7 und 5F4 mikroskopisch verfolgt und mit dem in nicht transfizierten Zellen verglichen (Abb. 4-24).



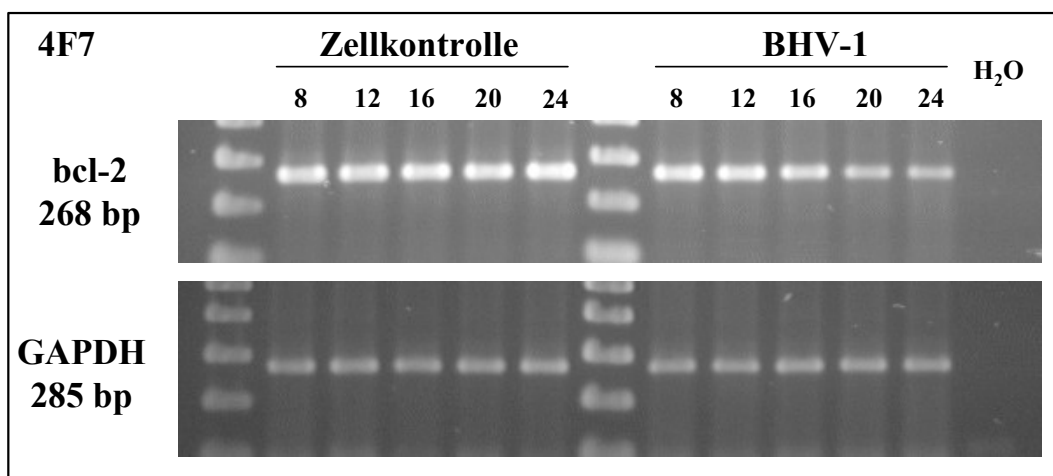
**Abb. 4-24:** Auswirkung der Infektion mit BHV-1 "Colorado" auf Bcl-2-überexprimierende Zellen. Die drei überexprimierenden Klone 2B3, 4F7 und 5F4 wurden mit BHV-1 (MOI = 1) infiziert und der Infektionsverlauf mikroskopisch bewertet. Die Überexpression des Bcl-2-Proteins konnte das Auftreten des CPE nicht unterbinden. (Phasenkontrast; Vergrößerung: 148 x)

Die ersten Anzeichen eines virusbedingten CPE zeigten sich in den PT-Zellen bereits 8 h p.i.. Die Zellen begannen sich abzukugeln, und im Cytoplasma wurden erste Vakuolen sichtbar. Das Auftreten eines CPE trat in den Bcl-2-überexprimierenden Zellen lediglich mit einigen Stunden Verspätung auf, er konnte durch die Anwesenheit des

antiapoptotischen Proteins nicht unterbunden werden. Bereits 24 h p.i. entsprach das Bild dem der PT-Zellen.

#### 4.3.8 Analyse des bcl-2-mRNA-Niveaus im Verlauf der BHV-1-Infektion

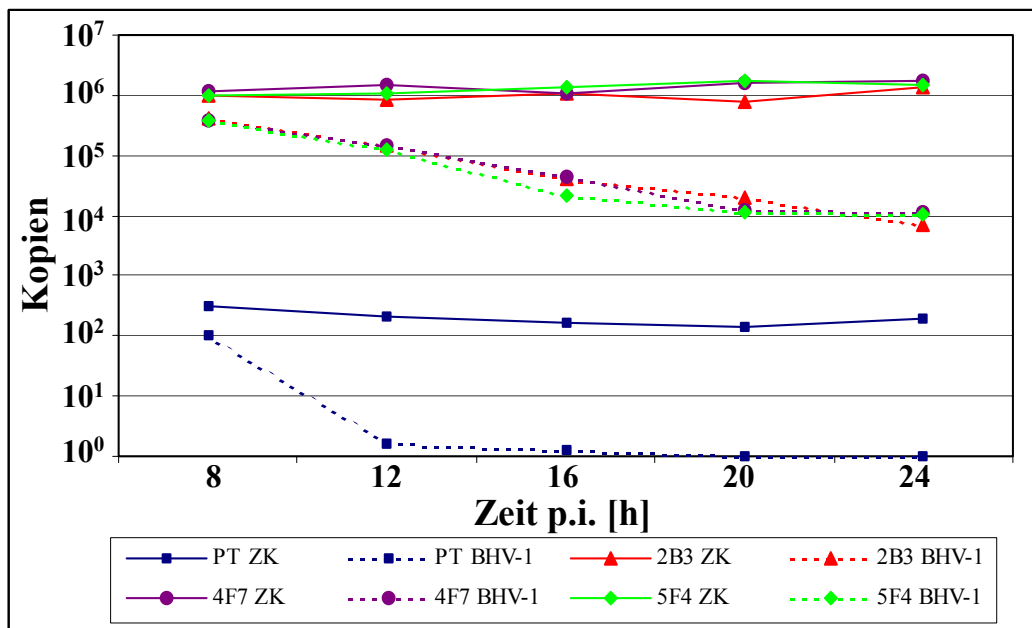
Der vorangegangene Versuch zeigte, dass die Apoptoseinduktion durch BHV-1 durch eine Überexpression nicht eindeutig inhibiert werden konnte. Um zu untersuchen, ob auch die Expression des rekombinanten Bcl-2-Proteins von der Infektion beeinflusst wird, wurde basierend auf dem PCR-Protokoll (DEVIREDDY und JONES, 1999) zunächst eine RT-PCR zum spezifischen bcl-2-Nachweis durchgeführt und durch eine *real-time* PCR ergänzt (exemplarische Darstellung der 4F7-Zellen in Abb. 4-25 und Abb. 4-26). So konnte eine vergleichende Studie der Anzahl der in der Zelle vorliegenden mRNA-Kopien ermittelt und eventuelle Unterschiede aufgezeigt werden.



**Abb. 4-25:** PCR zum Nachweis von bcl-2-RNA in BHV-1-infizierten Bcl-2-überexprimierenden PT-Zellen. 8, 12, 16, 20 und 24 h p.i. wurden infizierte sowie nicht infizierte Zellen lysiert und anschließend die RNA isoliert. 3 µg der RNA wurden in einer RT-PCR zum spezifischen Nachweis der bcl-2-mRNA eingesetzt. Die Infektion führte 20 h p.i. zu einer Veränderung des bcl-2-mRNA-Niveaus. Im Gegensatz zu den nicht überexprimierenden PT-Zellen (Abb. 4-20) war auch 24 h p.i. ein spezifisches Produkt nachweisbar.

In nicht transfizierten PT-Zellen lag die Kopienzahl zwischen  $10^2$  und  $10^{2,5}$ . Bereits 12 h nach der Infektion mit BHV-1 fiel dieser Wert in den Bereich der Nachweisgrenze. 16 h p.i. konnte keinerlei bcl-2 RNA mehr detektiert werden.

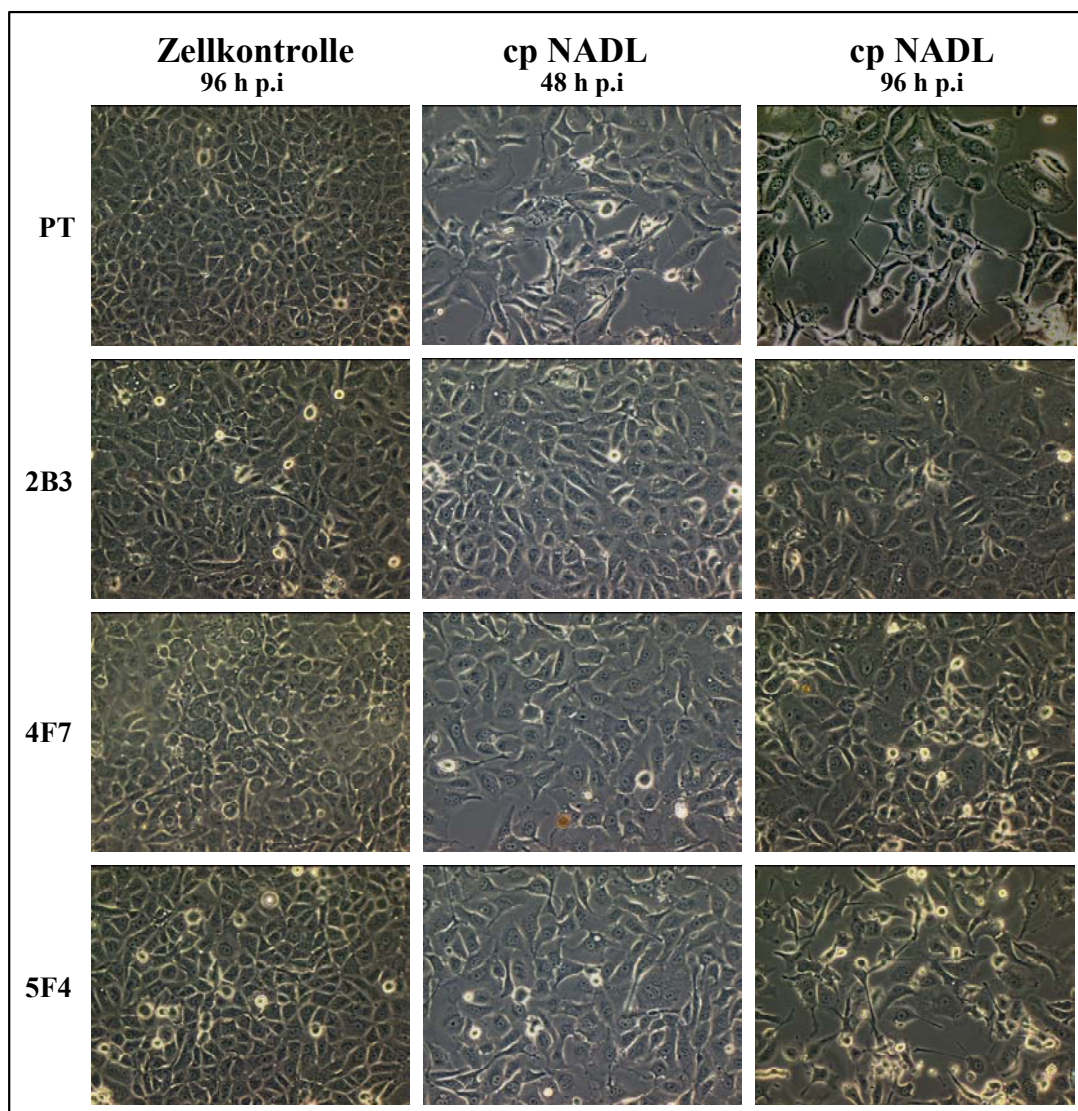
Die Kopienzahl der drei Bcl-2-überexprimierenden PT-Zelllinien betrug ca.  $10^6$  Kopien und war damit um vier Potenzen gegenüber der nicht-transfizierten Kontrolle erhöht. Auch in den das Bcl-2-Protein überexprimierenden Zellen sank die Kopienzahl infolge der Infektion mit BHV-1 deutlich ab. 24 h p.i. betrug die Differenz zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen zwei Potenzen. Dennoch bleibt festzuhalten, dass die Bcl-2-überexprimierenden Zellen zum Zeitpunkt 24 h p.i., an dem bereits deutliche Merkmale eines CPE sichtbar waren, noch ca.  $10^4$  Kopien der bcl-2-RNA vorlagen. Sie konnten das Auftreten des CPE jedoch weder vollständig unterbinden noch signifikant verzögern.



**Abb. 4-26:** Untersuchung des *bcl-2*-mRNA-Niveaus im Verlauf der BHV-1-Infektion. 3 µg der Gesamt-RNA infizierter und nicht infizierter Zellen wurden in einer real time PCR vergleichend mit einem RNA-Standard auf die Expression von *bcl-2*-mRNA hin untersucht. Auch in den über-exprimierenden Zellen kam es zu einer signifikanten Abnahme der *bcl-2*-mRNA.

#### 4.3.9 Wirkung der cp BVD-Virusinfektion auf Bcl-2-überexprimierende Zellen

Nachdem die Wirkung der BHV-1-Infektion auf die Bcl-2-überexprimierenden PT-Zellen analysiert wurde, sollten die Versuche mit dem cp BVD-Virus NADL wiederholt werden. Hierfür wurden die Zellen in einer MOI = 1 infiziert und zunächst alle 24 h mikroskopisch begutachtet. In Abb. 4-27 sind die Zeitpunkte 48 h bzw. 96 h p.i. aufgeführt. Die nicht-transfizierten PT-Zellen zeigten bereits 24 h p.i. erste Anzeichen eines CPE. Die Zerstörung des Zellrasens war nach 48 h p.i. deutlich erkennbar.



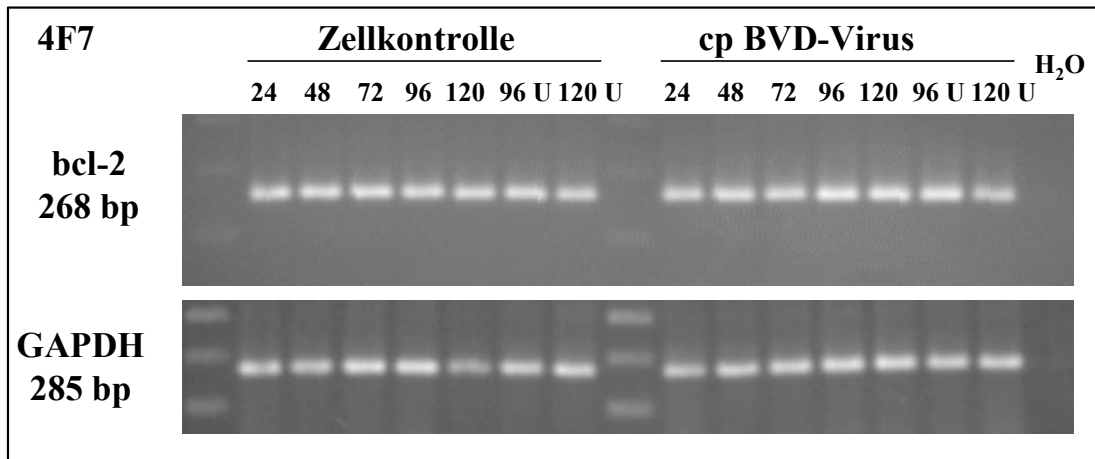
**Abb. 4-27:** Auswirkung der Infektion mit cp BVD-Virus NADL auf Bcl-2-überexprimierende Zellen. Die drei überexprimierenden Klone 2B3, 4F7 und 5F4 wurden mit cp BVD-Virus (MOI = 1) infiziert und der Infektionsverlauf mikroskopisch bewertet. Die Überexpression des Bcl-2-Proteins verzögerte das Auftreten des CPE. (Phasenkontrast; Vergrößerung: 148 x)

Demgegenüber war der Zellrasen in den drei überexprimierenden PT-Zellen noch intakt. Lediglich das Wachstumsverhalten war gegenüber den nicht infizierten Zellkontrollen deutlich verlangsamt. Nach 96 h p.i. wurden in PT 5F4 deutliche Zeichen eines CPE sichtbar. Der Zellrasen in 2B3 und 4F7 war zu diesem Zeitpunkt noch geschlossen, was für einen inhibitorischen Effekt der Bcl-2-Überexpression sprach. Die Verzögerung der Apoptoseinduktion konnte bis 120 h p.i. nachgewiesen werden. Um zu prüfen, ob dieser Effekt auch nach dem Umsetzen der Zellen erhalten bleibt, wurde nach 72 h p.i. eine Zellpassage durchgeführt. Interessanterweise führte dies innerhalb von 24 h zu einer deutlichen CPE-Ausprägung (Daten nicht gezeigt).

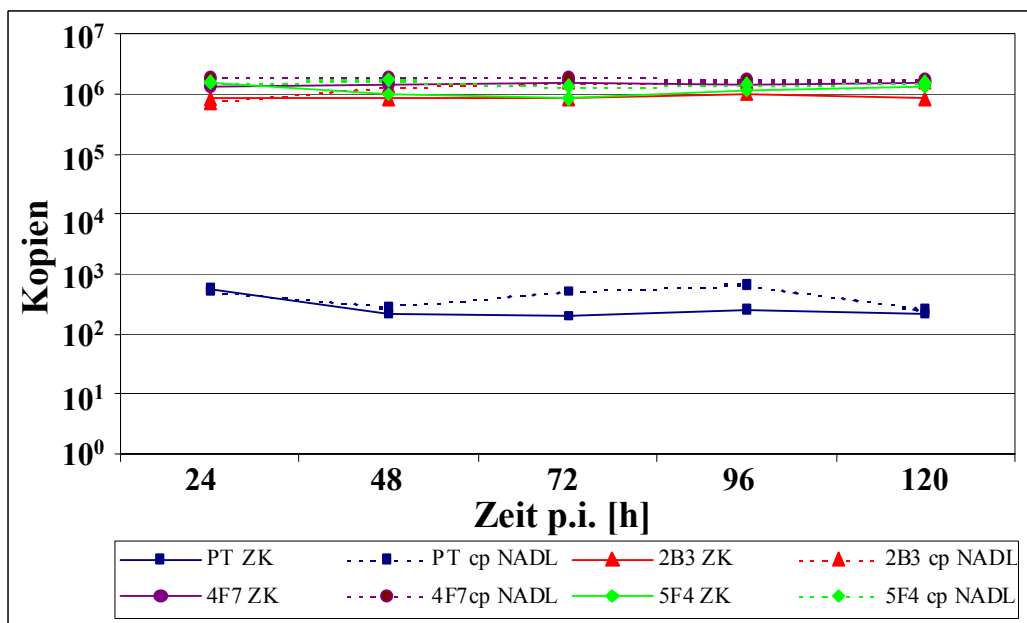


#### 4.3.10 Analyse des *bcl-2*-mRNA-Niveaus im Verlauf der cp BVD-Virusinfektion

Die Analyse des *bcl-2*-mRNA-Niveaus im Verlauf der cp BVD-Virusinfektion erbrachte im Vergleich zur Infektion mit BHV-1 ein gänzlich anderes Bild (exemplarische Darstellung der 4F7-Zellen in Abb. 4-28 und Abb. 4-29).



**Abb. 4-28:** PCR zum Nachweis von *bcl-2*-RNA in BVD-virusinfizierten *Bcl-2*-überexprimierenden PT-Zellen. 24, 36, 48, 60, 72, 96, 120 h p.i. sowie nach einer Vereinzelnung der Zellen 7 h p.i. und anschließender Inkubation (96 U, 120 U) wurden infizierte sowie nicht infizierte Zellen lysiert und anschließend die RNA isoliert. 3 µg der RNA wurden in einer RT-PCR zum spezifischen Nachweis der *bcl-2*-mRNA eingesetzt. Die Infektion mit cp BVD-Virus beeinflusste das *bcl-2*-mRNA-Niveau nicht.



**Abb. 4-29:** Untersuchung des *bcl-2*-mRNA-Niveaus im Verlauf der Infektion mit cp BVD-Virus. 3 µg der Gesamt-RNA infizierter und nicht infizierter Zellen wurden in einer real time PCR vergleichend mit einem RNA-Standard auf die Expression von *bcl-2*-mRNA hin untersucht. Die Infektion beeinflusste das *bcl-2*-mRNA-Niveau nicht.

Weder in den nicht-transfizierten PT-Zellen noch in den transfizierten veränderten sich die bcl-2-mRNA-Kopienzahlen signifikant. Die Virusreplikation und Virusfreisetzung war von der Überexpression jedoch nicht beeinträchtigt (Daten nicht gezeigt). Demzufolge führte die Infektion mit dem cp Biotyp weder zu einer veränderten bcl-2-Transkription noch zu einer gezielten Degradierung der bcl-2-mRNA.

## 5 Diskussion

Die Apoptoseinduktion auf zellulärer Ebene stellt eine effektive und weitverbreitete Abwehrreaktion des Wirtsorganismus auf eine Virusinfektion dar, um die virale Replikation und das Übergreifen neugebildeter Viruspartikel auf nicht infizierte Gewebe und Organe zu verhindern.

Untersuchungen aus den 90er Jahren führten zu der Erkenntnis, dass die Infektion mit dem cp Biotyp des BVD-Virus sowohl im Rind als auch in permissiven Zellkulturen zu einer Apoptoseinduktion führt (ZHANG et al., 1996; GRUMMER et al., 1998; LAMBOT et al., 1998). In infizierten Zellen konnte neben der charakteristischen Fragmentierung der DNA auch die proteolytische Spaltung des Kernenzym Poly-(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) gezeigt werden (ZHANG et al., 1996; HOFF und DONIS, 1997).

Möglicherweise spielt die unterschiedliche Expression des NS2-3-Proteins in BVD-virusinfizierten Zellen eine Schlüsselrolle. Das NS2-3 wird von allen Zellen exprimiert, die mit dem ncp Biotyp infiziert sind, und verfügt über eine Serin-Protease-, RNA-Helicase- und eine RNA-abhängige NTPase-Aktivität (WISKERCHEN und COLLETT, 1991; TAMURA et al., 1993; WARRENER und COLLETT, 1995). In Zellen, die mit dem cp Biotyp infiziert sind, wird als zusätzliches Protein das NS3 exprimiert, welches kolinear mit dem C-terminalen Ende des NS2-3 ist (GREISER-WILKE et al., 1992; GREISER-WILKE et al., 1993). Das exklusive Auftreten des NS3 in mit cp BVD-Virus infizierten Zellen wurde daher mit der Cytopathogenität in Verbindung gebracht. Es verfügt über dieselben Aktivitäten wie das NS2-3. Der Entstehung des NS3 liegen abhängig vom Virusstamm unterschiedliche Ursachen zugrunde. Neben Mutationen, können auch Insertionen und Genduplikationen im Bereich des NS2-3 zur Prozessierung des NS3 führen (MEYERS et al., 1989; MEYERS et al., 1991a; QI et al., 1992; GREISER-WILKE et al., 1993). Inwiefern das multifunktionale Enzym NS3 in den Zellstoffwechsel eingreift und letztendlich Apoptose induziert, ist bisher nicht bekannt.

Spätere Untersuchungen, die sich mit der Funktion des Strukturproteins E<sup>ms</sup> beschäftigten, ließen jedoch die Vermutung zu, dass das NS3 nicht der einzige verantwortliche Faktor für die cytopathogenen Eigenschaften des BVD-Virus ist. Aufgereinigtes E<sup>ms</sup> war in der Lage, Apoptose in lymphoiden Zellen zu induzieren (BRUSCHKE et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde daher die potentiell proapoptotische Wirkung des E<sup>ms</sup> unterschiedlicher BVD-Virusisolate und die damit verbundene Funktion im Verlauf der BVD-Virusinfektion näher charakterisiert.

Ein zweiter Schwerpunkt lag in der Untersuchung der Geschehnisse auf zellulärer Ebene im Verlauf der BVD-Virusinfektion. Die bisherigen Kenntnisse ermöglichen lediglich ein unvollständiges Verständnis der Reaktion der Wirtszelle. Demzufolge

wurden die Mechanismen, die an der Apoptoseinitiation in mit cp BVD-Virus infizierten Zellen beteiligt sind, weitergehend analysiert.

## 5.1 Einfluss des E<sup>rns</sup> auf bovine Zellkulturen

Die Hülle der Pestiviren enthält drei Glykoproteine, das E<sup>rns</sup>, das als Membrananker fungierende E1 und das Hauptimmunogen E2. Tiere, die mit Pestiviren infiziert werden, bilden jedoch auch gegen das E<sup>rns</sup> schwach neutralisierende Antikörper (DONIS und DUBOVI, 1987; BOLIN et al., 1988; STARK et al., 1990; WEILAND et al., 1990; RUMENAPF et al., 1993). Die Funktion des E<sup>rns</sup> ist dennoch noch nicht schlüssig geklärt worden, obwohl gezeigt werden konnte, dass es wie das E2 für die Anheftung und den Eintritt in die Zielzelle unentbehrlich ist (HULST et al., 2000; IQBAL et al., 2000). Das E<sup>rns</sup> liegt im Virion als Homodimer vor und wird von infizierten Zellen in größeren Mengen sezerniert (RUMENAPF et al., 1993; WINDISCH et al., 1996). Es zählt zur Familie der extrazellulären RNasen, zu der auch RNasen diverser Fungi und Pflanzen wie *Nicotiana glauca* gehören (HULST und MOORMANN, 1994). Das aktive Zentrum der RNase-Aktivität wird von zwei homologen Domänen gebildet, die jeweils aus acht Aminosäuren bestehen. Die Domänen sind im Fall des E<sup>rns</sup> durch 38 nicht-homologe Aminosäuren voneinander getrennt. In beiden Domänen befinden sich Histidinreste, die für die RNase-Aktivität essentiell erscheinen (HULST und MOORMANN, 1994). Generell können RNase-Aktivitäten diverse biologische Aktivitäten signifikant beeinflussen. Hierzu zählt u.a. die immunsuppressive Wirkung. Hier konnte gezeigt werden, dass aufgereinigtes E<sup>rns</sup> basierend auf dem CSF-Virus-C-Stamm die durch Concanavalin A stimulierte Lymphocytenproliferation unterschiedlichster Spezies vollständig inhibieren und darüber hinaus Apoptose induzieren kann (BRUSCHKE et al., 1997). Die Inaktivierung der RNase-Aktivität des E<sup>rns</sup> aus CSF-Virus resultierte in einem cytopathogenen Virus (HULST et al., 1998). Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass das E<sup>rns</sup> eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Pestiviren spielt.

Vor diesem Hintergrund sollte die Fähigkeit des E<sup>rns</sup>-Proteins, nach transienter bzw. stabiler Expression in für das BVD-Virus permissiven Zellen Apoptose zu induzieren, untersucht werden. Hierbei sollten die potentiell unterschiedlichen Eigenschaften berücksichtigt werden, die eventuell auf dem BVD-Virusstamm beruhen, der als Basis für die Expression diente. Als erster Schritt wurde das E<sup>rns</sup> unterschiedlicher BVD-Virusstämme daher zunächst auf Genomebene analysiert. Hierfür wurde die Gensequenz mittels RT-PCR amplifiziert und in ein entsprechendes Expressionsvektorsystem inkloniert. Es wurden drei verschiedene Strategien verfolgt. Zum einen wurde ein Fragment von 680 bp verwendet, welches dem eigentlichen E<sup>rns</sup> entsprach, zum anderen wurde ein Konstrukt von 735 bp eingesetzt, welches am N-Terminus zusätzlich den C-terminalen Bereich des Capsid-Proteins enthielt. Des Weiteren wurde ein System gewählt, welches bedingt durch die Vektoreigenschaften die Sezernierung des E<sup>rns</sup> in den Zellkulturüberstand gewährleisten sollte. Die Sequenzierung und der darauffol-

gende Sequenzvergleich zeigten deutlich, dass die Primärstruktur der RNase-Domänen innerhalb der untersuchten Pestiviren in hohem Maße konserviert sind. Variationen traten lediglich im Bereich des N- und C-terminalen Bereiches auf. Es konnten jedoch keinerlei signifikante Unterschiede festgestellt werden, die die Cytopathogenität der cp Biotypen erklären könnten. Demzufolge müssen eventuelle Abweichungen auf der Ebene der Sekundär- bis Quartärstruktur des Proteins zu finden sein. Dies sollte durch Expression der jeweiligen Konstrukte in bovinen Zellen überprüft werden. Zuerst mussten jedoch für die Transfektion von Plasmid-DNA geeignete Zellen gesucht werden. Wider Erwarten eigneten sich die für Infektionsstudien oft verwendeten MDBK-Zellen nicht für die Expression von Fremdproteinen, da sich das E<sup>ms</sup> entweder gar nicht oder nur zu einem sehr geringen Anteil [1 %] nachweisen ließ. Auch die nicht permanente Zelllinie FKN konnte nicht verwendet werden, da sich die Transfektionsreaktionen cytotoxisch auswirkten. Lediglich die aus der Kälberniere etablierte PT-Zelllinie zeigte mit 20 bis 25 % eine geeignete Expressionsrate, erreichte jedoch nicht die Werte der cos-7-Zellen aus der Grünen Meerkatze. Da diese jedoch nicht für das BVD-Virus permissiv sind, wurden die weiteren Versuche mit PT-Zellen durchgeführt.

Die Analyse der Expression der einzelnen Konstrukte führte zu zweierlei Erkenntnissen: Die dem eigentlichen E<sup>ms</sup> vorgeschaltete Signalsequenz, die dem C-Terminus des Capsid-Proteins entspricht, ist essentiell für die Stabilität und die Lokalisation des E<sup>ms</sup>. Fehlt diese Signalsequenz, ist das rekombinante E<sup>ms</sup> nicht nachweisbar. Die Integration der Signalsequenz in das Gen führte jedoch zur Expression und wirkte sich auch auf die Lokalisation des rekombinanten E<sup>ms</sup> aus. Das transient in den Zellen exprimierte rekombinante E<sup>ms</sup> war ebenso membranassoziiert wie es für das virale Protein im Verlauf der BVD-Virusinfektion beschrieben wurde (GRUMMER et al., 2001). Das Ersetzen der Signalsequenz durch die Igk-Leader-Sequenz führte zu einem vergleichbaren Resultat. Interessanterweise konnte keines der erzeugten rekombinanten Proteine mittels ELISA im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden. Entgegen vorheriger Untersuchungen zur Charakterisierung des E<sup>ms</sup> des CSF-Virus, die denselben Nachweis der Sezernierung nutzten, verblieb das rekombinante Protein unabhängig von der angefügten Signalsequenz in der Zelle (JAHNZ, 1999). Dies spricht für eine gestörte Transportkette in den E<sup>ms</sup>-exprimierenden Zellen, die zu einer Retention des rekombinanten E<sup>ms</sup> im ER führt. Da die gegen das E<sup>ms</sup> gerichteten mAk auch die rekombinanten Proteine erkannten, ist davon auszugehen, dass die Proteinfaltung nicht beeinträchtigt war. Eine Prüfung der RNase-Aktivität der einzelnen E<sup>ms</sup>-Proteine war nicht möglich, da eine Sezernierung in den Zellkulturüberstand unterblieb. Der Nachweis in Zelllysaten transfizierter Zellen war aufgrund der Aktivität zellulärer RNasen nicht gegeben (HULST et al., 1998). Eine Alternative wäre lediglich der Wechsel auf ein anderes Expressionssystem, was den direkten Vergleich wiederum verhindern würde.

Die vergleichende Untersuchung des E<sup>ms</sup> unterschiedlicher Virusstämme erbrachte keinerlei signifikante Unterschiede. Sowohl die Lokalisation als auch die Transfektionseffizienzraten waren unabhängig von den Eigenschaften des Virusstamms, von dem das

E<sup>ms</sup>-Gen stammte. Eine apoptotische Wirkung des E<sup>ms</sup> auf die transfizierten Zellen wurde bei keinem der erzeugten rekombinanten Proteine nachgewiesen.

In einem weiteren Schritt wurde das E<sup>ms</sup> basierend auf dem Gen des cp BVD-Virus NADL stabil in PT-Zellen exprimiert. Sollte es möglich sein, das E<sup>ms</sup> über einen längeren Zeitraum als 72 h nachzuweisen und darüber hinaus eine E<sup>ms</sup>-exprimierende Zelllinie zu erzeugen, die keinerlei charakteristische Merkmale eines CPE aufweist, so wäre davon auszugehen, dass das E<sup>ms</sup> des BVD-Virus NADL allein nicht fähig ist, Apoptose in epitheloiden Zellen zu induzieren.

Durch Selektion mit dem Antibiotikum Zeocin wurden daraufhin E<sup>ms</sup> exprimierende PT-Zellen angereichert, rekloniert und mittels mAk charakterisiert. Das rekombinante E<sup>ms</sup> war auch nach mehreren Wochen der Kultivierung in den Zellen nachweisbar, wobei die Zellen weder ihre Morphologie veränderten noch eine im Vergleich zu den nicht-transfizierten PT-Zellen erhöhte Apoptoserate zeigten. Die Daten deuten darauf hin, dass das BVD-Virus-E<sup>ms</sup> nach Transfektion in epitheloide Zellen nicht in der Lage ist, ähnlich wie in Lymphocytenkulturen Apoptose zu induzieren. Eine mögliche Ursache hierfür könnte in der Konzentration zu suchen sein. In den zuvor beschriebenen Versuchen wurde das E<sup>ms</sup> des CSF-Virus stets durch die Infektion von Insektenzellen mit rekombinanten Baculoviren synthetisiert, aufgereinigt und den Lymphocyten als löslicher Faktor in Konzentrationen bis zu 0,4 µM zugesetzt, wobei erste immun-suppressive Effekte ab einer Konzentration von 0,05 µM beschrieben wurden (BRUSCHKE et al., 1997). Diese Konzentrationen werden in transfizierten Zellen nicht erreicht. Zusätzlich sollte berücksichtigt werden, dass die hier erzeugten rekombinanten E<sup>ms</sup>-Proteine nicht als lösliche Proteine in den Zellkulturüberstand abgegeben wurden, obwohl die Proteinlokalisierung der des nativen E<sup>ms</sup> entsprach. Demzufolge könnte auch hier eine mögliche Erklärung begründet sein. Da ein Retentionssignal für den Verbleib des E<sup>ms</sup> im ER wahrscheinlich ist, könnte hier daher ergänzend zum N-terminalen Transportsignal der Austausch des C-Terminus hilfreich sein. Zudem wurde auch gezeigt, dass die Inkubation des löslichen E<sup>ms</sup> auf zwei epitheloide Zelllinien (SK6 und EBTr) keinen bedeutenden Einfluss hatte (BRUSCHKE et al., 1997). Zusammen mit der Erkenntnis, dass die durch die Infektion mit dem CSF-Virus *in vivo* Leukopenie, auf eine erhöhte Apoptoserate in B- und T-Lymphocyten zurückzuführen ist (SUMMERFIELD et al., 1998), liegt die Vermutung nahe, dass das E<sup>ms</sup> zellspezifische Funktionen *in vivo* erfüllt. Da die Infektion von Zellkulturen mit CSF-Virus jedoch nicht zur Apoptoseinduktion führte, bleibt die Rolle des E<sup>ms</sup> in nicht-lymphoiden Zellen weiterhin ungeklärt. Hier rückt wieder die bis dato ungeklärte Funktion der RNase-Aktivität in das Zentrum des Interesses, da sie u.a. an der Degradierung zellulärer Ribonucleinsäuren beteiligt sein könnte bzw. regulatorische Funktionen übernehmen könnte. Die Infektion porciner Zellen mit rekombinanten CSF-Viren, die eine Deletion im Bereich der RNase-Aktivität haben, führen zur Entstehung eines cytopathogenen Virus. Eine Expression des charakteristischen NS3 war hingegen nicht nachweisbar, so dass die exklusive Wirkung des NS3 in Frage gestellt werden kann (HULST et al., 1998). Ob die Erkenntnisse auf das E<sup>ms</sup> des BVD-Virus übertragen können, wurde

bisher nicht geklärt. Da die abgeleiteten Proteinsequenzen der hier untersuchten ncp BVD-Virusstämme keinerlei Mutationen in den RNase-Domänen aufwiesen, kann lediglich über alternative Sekundärstrukturen spekuliert werden.

Weitere denkbare Versuchsansätze wären daher zum einen die Koexpression der drei Glykoproteine, um Kenntnisse über eventuell auftretende komplementative Effekte zu erhalten. Auch eine Koexpression mit dem NS2-3 könnte neue Hinweise auf die Funktion des E<sup>ms</sup> geben.

Untersuchungen, die sich mit dem Core-Protein des HCV beschäftigten, erhärten die Vermutung, das auch das Core-Protein neben seiner Hauptfunktion proapoptotische Wirkung haben kann (GOH et al., 2001). Allerdings wurde ihm in weiteren Untersuchungen antiapoptotische Funktionen zugeschrieben (MARUSAWA et al., 1999; OTSUKA et al., 2002), so dass zur Klärung weiterer Funktionen neben der Bildung des Viruscapsids beim BVD-Virus das Zusammenspiel von Capsid und E<sup>ms</sup> interessant wäre.

Da eine Apoptoseinduktion infolge der Expression des E<sup>ms</sup>-Proteins in bovinen Zellen nicht nachweisbar war, wurden die Ereignisse infolge der BVD-Virusinfektion auf zellulärer Ebene näher untersucht, um Hinweise auf eine eventuelle Unterschiede zwischen der Infektion mit cp und ncp BVD-Virus zu erhalten.

## 5.2 Apoptosekaskade in mit cp BVD-Virus infizierten Zellen

Während der letzten Jahre konnte für eine Vielzahl von Viren gezeigt werden, dass sie in ihren Wirtszellen Apoptose induzieren können (RAZVI und WELSH, 1995; GRUMMER und GREISER-WILKE, 1998; EVERETT und MCFADDEN, 1999). Die ihnen zugrunde liegenden zellulären Mechanismen sind bisher meist jedoch nur unzureichend geklärt. Auch die Infektion mit dem cp Biotyp des BVD-Virus führt sowohl in einer permissiven Zellkultur als auch *in vivo* zur Apoptoseinduktion (ZHANG et al., 1996; HOFF und DONIS, 1997; LAMBOT et al., 1998; TEICHMANN et al., 2000; FRINK et al., 2002; GRUMMER et al., 2002b). Die Kenntnisse über die apoptotischen Prozesse sind jedoch auch hier nur bruchstückhaft. Ein Ziel war es daher, die durch die Infektion mit dem cp BVD-Virus ausgelöste Apoptosekaskade *in vitro* näher zu charakterisieren und in den bisherigen Wissensstand zu integrieren.

Basierend auf dem initialen Signal zur Apoptoseinduktion einer virusinfizierten Zelle werden zwei Signalkaskaden unterschieden: Der auf die Bindung eines Liganden an seinen zugehörigen Oberflächenrezeptor beruhende „*extrinsic pathway*“ und der durch die infizierte Zelle selbst initiierte „*intrinsic pathway*“, mit den Mitochondrien als Schlüsselorganellen. Eine exakte Abgrenzung der beiden Wege ist jedoch nicht immer möglich (RASPER et al., 1998; FERRI und KROEMER, 2001a).

Mit BVD-Virus infizierte Zellkulturen sezernieren unabhängig vom Biotyp das Glykoprotein E<sup>ms</sup>. Dies ist jedoch nicht in der Lage, in allen Zellen Apoptose zu

induzieren und kommt daher als löslicher „Faktor X“ nicht in Betracht, um den *extrinsic pathway in vitro* initiieren zu können. Dementsprechend wurden weitergehende Versuche durchgeführt, um einen solchen Faktor zu identifizieren. Hierfür wurde virus-haltiger Zellkulturüberstand durch UV-Strahlung inaktiviert und anschließend auf neue Zellkulturen gegeben (GRUMMER, 1999b). Auch hier unterblieb die Apoptose-induktion, so dass davon auszugehen ist, dass der Apoptoseweg über den „*extrinsic pathway*“ infolge einer Infektion mit dem cp BVD-Virus *in vitro* sehr unwahrscheinlich ist. Statt dessen müsste das Signal von der infizierten Zelle selbst ausgehen, weshalb das Hauptaugenmerk auf die Analyse des *intrinsic pathway* gelegt wurde. Den Mitochondrien wird hier entgegen früherer Annahmen eine Hauptrolle zugeschrieben. Dementsprechend konzentrierten sich die Untersuchungen zunächst auf eine mögliche mitochondriale Beteiligung im Verlauf der BVD-Virusinfektion. Es konnte gezeigt werden, dass das mitochondriale Transmembranpotential  $\Delta\Psi_m$  im Verlauf der Infektion mit dem cp BVD-Virus bereits vor dem Auftreten erster charakteristischer Apoptosemerkmale zerstört ist, während das ncp BVD-Virus keinerlei Auswirkungen auf die mitochondriale Integrität ausübt. Diese Ergebnisse bestätigen frühere Erkenntnisse (GRUMMER, 1999a). Der Zusammenbruch des  $\Delta\Psi_m$  erfolgt nicht nur infolge von Virusinfektionen (KO und PRIVES, 1996; JACOTOT et al., 2000; CARRASCOSA et al., 2002). Auch andere proapoptotische Stimuli wie UV-Strahlung oder Chemikalien wirken sich negativ auf die Integrität der Mitochondrienmembran aus (ARNOULT et al., 2002). Ähnliches wurde auch für das CSF-Virus innerhalb der Familie *Flaviviridae* beschrieben (SUMMERFIELD et al., 2001).

Die Ursache für den Zusammenbruch des  $\Delta\Psi_m$  und der damit verbundene „*point of no return*“ nach der Infektion mit cp BVD-Virus haben ihre Ursache aller Wahrscheinlichkeit nach in der unkontrollierten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), deren Entstehung größtenteils während der Atmungskette in den Mitochondrien erfolgt. Die Inkubation von infizierten Zellen mit Antioxidantien wie Ascorbinsäure oder Ebselen konnten das durch die Infektion dysregulierte Gleichgewicht wiederherstellen und das Auftreten eines CPE deutlich verzögern, ohne dabei die virale Replikation zu beeinträchtigen (SCHWEIZER und PETERHANS, 1999; GRUMMER et al., 2002a). Der unkontrollierte Anstieg von ROS wurde auch nach Infektion mit HIV beobachtet (JACOTOT et al., 2000) und als Folge der Infektion mit cp BVD-Virus postuliert (SCHWEIZER und PETERHANS, 1999). Untersuchungen der Ereignisse im ER in mit cp BVD-Virus infizierten Zellen zeigten die Aktivierung der PKR-like ER-Kinase (PERK), welche durch Hyperphosphorylierung des Translationsinitiationsfaktors eIF $\alpha$  ER-Stress induziert (JORDAN et al., 2002). Die Morphologie des ER bleibt davon jedoch unbeeinflusst (GRUMMER, 1999a). Die durch den Stress provozierte Calcium-Freisetzung in das Cytosol kann den Zusammenbruch des  $\Delta\Psi_m$  noch forcieren.

Die anschließende Untersuchung der intrazellulären Calcium-Verteilung mittels des fluoreszierenden Indikators Calcium Green 2 zeigte eine deutliche Akkumulation von Calcium-Ionen im Cytoplasma in Zellen, die mit cp BVD-Virus infiziert waren. Calcium stellt als *second messenger* ein wichtiges Bindeglied vieler Signalkaskaden



dar. und spielt als Signalmolekül eine bedeutende Rolle u.a. im Tricarbonsäure-Zyklus und während der ATP-Synthese (MCCONKEY und ORRENIUS, 1996). Unter physiologischen Bedingungen liegt es hauptsächlich in den Mitochondrien vor. Ein weiterer Pool ist das ER (FERRI und KROEMER, 2001b). In nicht-apoptotischen Zellen befindet sich das Verhältnis zwischen Calcium-Influx und -Efflux in einem *steady state*. Signale wie beispielsweise oxidativer Stress resultieren jedoch in einer Verschiebung dieses Gleichgewichts, welche den unkontrollierten Einstrom von Calcium in die Mitochondrien zur Folge haben und damit den Weg für die Initiation des *intrinsic pathway* bereiten (CROMPTON, 1999). Der Calcium-Stoffwechsel der Mitochondrien wird durch einen Multiproteinkomplex, der *permeability transition pore*“ (PTP), reguliert (GREEN und AMARANTE-MENDES, 1998; KROEMER et al., 1998; CROMPTON, 1999). Die Dysregulation dieses Komplexes stellt eine Möglichkeit des unkontrollierten Transports kleiner Moleküle aus der Mitochondrienmatrix in das Cytoplasma der Zelle dar. Um eine mögliche Beteiligung der Pore zu analysieren, wurden Substanzen verwendet, die die Porenöffnung inhibieren, ohne dabei die oxidative Phosphorylierung selbst zu beeinträchtigen. Zur Anwendung kamen Ub<sub>5</sub> sowie das Ubiquinon-Derivat DCU und Cyclo A (FONTAINE et al., 1998). Während Ub<sub>5</sub> und Cyclo A keinerlei Effekt auf die Ausprägung des CPE infolge der Infektion mit dem cp Biotyp hatten, konnte die einmalige Zugabe von DCU das Auftreten des CPE um 48 h verzögern. Die Ergebnisse entsprachen nur teilweise den von Fontaine beschriebenen Auswirkungen, denen zufolge Cyclo A ebenfalls als potenter Poreninhibitor gilt, indem es an Cyclophilin D bindet. Die fehlende Wirksamkeit könnte auf eine geringere Stabilität des Cyclo A zurückzuführen sein. Dem Ub<sub>5</sub> wird jedoch keinerlei inhibitorische Aktivitäten zugeordnet (FONTAINE et al., 1998).

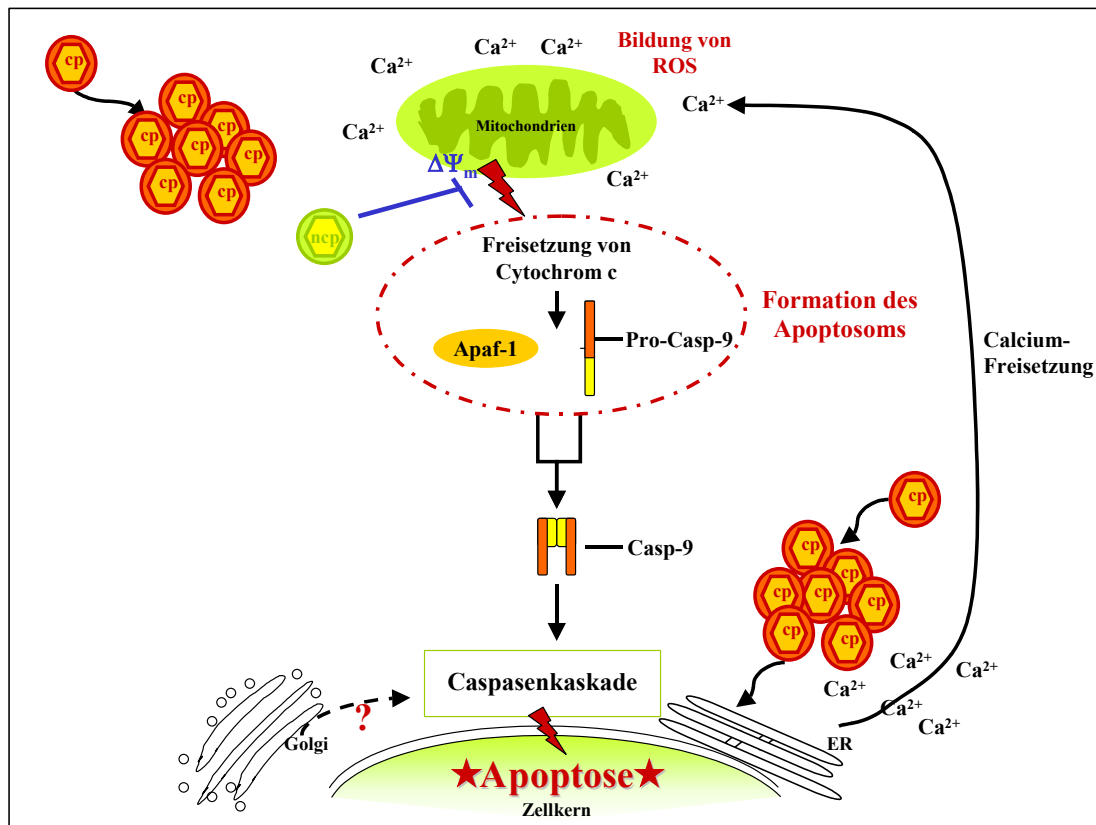
Neben den Cyclosporinen sind auch diverse zelluläre Proteine in der Lage, mit dem PTP-Proteinkomplex zu interagieren, und dessen Funktion dadurch zu beeinflussen (CROMPTON, 1999). Hierzu zählt auch ein Mitglied der Bcl-2-Familie, das proapoptotische Bax. Die Bcl-2-Familie ist in unterschiedliche Schritte der Apoptoseinduktion und -inhibition involviert (REED et al., 1998a; KORSMEYER, 1999). Bax ist in nicht-apoptotischen Zellen vornehmlich im Cytoplasma lokalisiert. Seine Expression wird u.a. durch das Kernenzym p53 reguliert. Infolge einer Apoptoseinduktion kann es jedoch zu einer Translokation des Bax in die Mitochondrienmembran kommen (WOLTER et al., 1997; GOPING et al., 1998). Die Untersuchung der Bax-Expression und -Lokalisation in BVD-virusinfizierten Zellen zeigte hier, dass eine Beteiligung des proapoptotischen Bax keine Rolle in der irreversiblen Öffnung der PTP und dem daraus resultierenden Zusammenbruch des  $\Delta\Psi_m$  spielt.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Integrität der Mitochondrien infolge der Infektion mit dem cp Biotyp durch die irreversible Öffnung der PTP zerstört wird, wurde geprüft, ob diese Ereignisse zur temporären Bildung des Apoptosoms führen. Das Apoptosom besteht aus Cytochrom C, welches aus den geschädigten Mitochondrien in das Cytoplasma freigesetzt wird, dem *Apoptosis-protease-activating factor-1* (Apaf-1) und der Pro-Caspase-9 (CHINNAIYAN, 1999). Die befristete Zusammen-

lagerung und unterschiedliche Konformationsänderungen in Anwesenheit von dATP oder ATP begünstigen die autoproteolytische Aktivierung der als Initiator-Caspase geltenden Caspase-9 (LI et al., 1997). Sie ist ihrerseits in der Lage, die Effektor-Caspasen –3 und –7 zu aktivieren, welche die Degradierung der zellulären Struktur durchführen (CHINNAIYAN, 1999). In Ermangelung eines direkten Nachweissystems wurden die Komponenten des Apoptosoms getrennt voneinander untersucht. So konnte die Cyt c-Freisetzung in das Cytoplasma cp BVD-virusinfizierter Zellen mittels Zellfraktionierung gezeigt werden. Apaf-1 liegt unter physiologischen Bedingungen inaktiv im Cytoplasma vor. Die Infektion mit dem cp BVD-Virus führte bereits früh zu einer gesteigerten Expression, wodurch von einer Beteiligung des Apaf-1 auszugehen ist. Da bislang keinerlei Kenntnisse über die Struktur der bovinen Caspasen vorliegen und keinerlei kreuzreaktive Antikörper gefunden wurden, erfolgte der Nachweis der Caspase-9-Aktivierung durch einen enzymatischen Test, der auf der Spaltung spezifischer Substrate und einer daraus resultierenden Farbstofffreisetzung basiert (GURTU et al., 1997; KOHLER et al., 2002). Dieser Test hatte den Vorteil, dass er im Gegensatz zu Antikörpern speziesunabhängig einsetzbar ist. Allerdings deuten die Ergebnisse auf eine erheblich geringere Sensitivität hin. Zwar war eine deutliche Caspase-9-Aktivierung nach 48 h p.i. nachweisbar, die 72 h p.i. fast das Dreifache der nicht infizierten Zellkontrolle erreichte, doch in Anbetracht dessen, dass erste sichtbare Anzeichen eines CPE bereits nach 24 h p.i. auftraten, musste es zu einer konzentrationsabhängigen zeitlichen Verschiebung kommen. Der Vergleich zwischen Caspase-3 und Caspase-9 macht diesen Konzentrationsunterschied deutlich. Die Effektorcaspase-3 liegt in apoptotischen Zellen in wesentlich höherer Konzentration vor als die regulatorisch wirkende Caspase-9 (COHEN, 1997; NICHOLSON und THORNBERRY, 1997; CHAN und MATTSON, 1999). Dementsprechend konnte die eigentlich durch Caspase-9 aktivierte Caspase-3 bereits 12 h vorher nachgewiesen werden. Bei der Analyse der Ergebnisse sollte dies stets berücksichtigt werden.

Mit Hilfe von Enzymtests konnte auch die Aktivierung der Caspasen –3 und –8 gezeigt werden (KLEIN, 1999), so dass von einer Aktivierung der Caspasenkaskade infolge der Bildung des Apoptosoms auszugehen ist. Ein Substrat der Caspase-3 ist das Kernenzym PARP, dessen Spaltung infolge einer cp BVD-Virusinfektion bereits nachgewiesen werden konnte (HOFF und DONIS, 1997).

Abb. 5-1 zeigt die hier postulierte Apoptosekaskade infolge der Infektion mit dem cp BVD-Virus.



**Abb. 5-1:** Apoptoseweg in mit cp BVD-Virus infizierten Zellen. Im Verlauf der Virusreplikation wird der second messenger Calcium ins Cytosol freigesetzt. Das daraus resultierende Ungleichgewicht führt zu einem verstärkten Calcium-Influx in die Mitochondrien und über eine Störung des mitochondrialen Transmembranpotentials  $\Delta\Psi_m$  und die Bildung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) letztlich zur Freisetzung von Signalmolekülen wie Cyt c. Das Cyt c lagert sich seinerseits mit Apaf-1 und der Pro-Caspase-9 zum Apoptosom zusammen, was in der Aktivierung der Caspasenkaskade mündet. Eine Inhibition der Apoptosekaskade im Verlauf der Infektion mit ncp BVD-Virus findet auf der Ebene der Mitochondrien statt.

### 5.3 Strategien zur Apoptoseinhibition

Da die Apoptoseinduktion infolge der Infektion mit cp BVD-Virus eher ungewollt abläuft und als limitierender Faktor für die Virusverbreitung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gilt, liegt die Vermutung nahe, dass das ncp BVD-Virus eine persistierende Infektion durch aktives Unterbinden der apoptotischen Prozesse etablieren kann.

Um einen Einblick in die molekularen Mechanismen der Apoptoseinhibition durch das ncp BVD-Virus zu erhalten, wurde in Anbetracht des leichten Anstiegs der Caspase-9-Aktivität 72 h p.i. zunächst die stetig wachsende Familie der Caspasen als potentiell Ziel näher untersucht. In Zellen, die mit dem cp Biotyp infiziert waren, konnten nach Anfärbung mit dem FITC-markierten Caspasenmarker bereits 16 h p.i. erste Aktivitäten gezeigt werden. Eine FACS-Analyse von Zellen, die 72 h mit dem ncp Biotyp infiziert waren, zeigte im Gegensatz dazu keinerlei Caspase-Aktivität. Um zu prüfen, ob eine

durch den Peptid-Inhibitor Z-VAD-FMK hervorgerufene vollständige Inhibition der Caspasen auch in einer Apoptoseinhibition resultiert, wurden primäre Zellkulturen mit dem cp BVD-Virus NADL infiziert. Der Inhibitor wirkte sich weder auf die Virusreplikation noch auf die Freisetzung der Nachkommenviren aus, unabhängig davon, ob die Zellen mit cp oder ncp BVD-Virus infiziert worden waren. Interessanterweise konnte Z-VAD-FMK das Auftreten des CPE deutlich verzögern, jedoch nicht vollständig unterbinden. Dies lässt vermuten, dass Caspasen eine wichtige Funktion während der exekutiven Phase der Apoptose in cp BVD-virusinfizierten Zellen spielen, jedoch nicht allein verantwortlich sind, wie es beispielsweise für das Sindbis Virus (NAVA et al., 1998) oder das Transmissible Gastroenteritis Virus (TGEV) der Schweine (ELEOUEY et al., 1998) beschrieben wurde. Hier führte die Inkubation infizierter Zellen mit dem Inhibitor jeweils zu einer vollständigen Blockade der Apoptosekaskade.

Um zu prüfen, ob der ncp Biotyp die Aktivität des Schlüsselenzyms der Caspasenkaskade beeinflusst, wurde die Wirkung von Staurosporin auf mit ncp BVD-Virus infizierten Zellen untersucht. Staurosporin erwies sich als potenter Apoptoseinduktor (MIRKES und LITTLE, 2000). Da davon auszugehen ist, dass für den protektiven Effekt der Virusinfektion die Synthese viraler Proteine erforderlich ist, wurde die Substanz erst 48 h p.i. zugesetzt. Die Infektion mit ncp BVD-Virus führte jedoch nicht zu einem Schutz gegenüber der durch die Chemikalie induzierte Apoptose. Damit konnten frühere Ergebnisse (SCHWEIZER und PETERHANS, 1999) bestätigt werden, welche ebenfalls keinen protektiven Effekt auf eine Staurosporin-Zugabe beobachteten. Zusammenfassend lässt sich daher feststellen, dass das ncp BVD-Virus die Apoptose der Zelle voraussichtlich nicht durch die Einwirkung auf die Caspase-3-Aktivität inhibiert.

Da die Infektion mit dem cp BVD-Virus *in vitro* zu einer Apoptoseinduktion über den *intrinsic pathway* führt, in dem die Mitochondrien eine maßgebliche Rolle innehaben, wurde in den fortführenden Studien eines der antiapoptotisch wirkenden Mitglieder der Bcl-2-Familie, der Prototyp Bcl-2 selbst, als mögliches Ziel der Inhibition durch das ncp BVD-Virus näher untersucht.

Die stetig wachsende Bcl-2-Familie besteht aus mittlerweile 18 Vertretern, die anhand ihrer pro- bzw. antiapoptotischen Funktion in drei Subgruppen eingeteilt werden (BORNER, 2003). Sie sind insbesondere in den *bcl-2-homology*-Regionen (BH1-4) hoch konserviert. Antiapoptotisch wirkende Proteine wie Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub> verfügen über alle vier Domänen, während alle proapoptotischen Proteine mindestens über die BH3 („BH3-only“-Subgruppe) jedoch maximal über die Domänen BH1-3 verfügen (ADAMS und CORY, 1998; GROSS et al., 1999; ANTONSSON und MARTINOY, 2000). Die regulatorischen Mechanismen, die der Funktion der Bcl-2-Familie zugrunde liegen, sind bisher noch nicht ausreichend geklärt. Eine Interaktion durch Dimerisierung der einzelnen Mitglieder über die BH3-Domäne wird jedoch vermutet (LUTZ, 2000). Im Gegensatz zum proapoptotischen Bax ist Bcl-2 hauptsächlich in den Membran-

systemen der Mitochondrien, des ER und des Zellkerns lokalisiert (KLUCK et al., 1997; WOLTER et al., 1997; GOPING et al., 1998).

Viele Viren beeinflussen die Funktion des Bcl-2-Proteins entweder durch viruscodierte Bcl-2-Homologe (vBcl-2) oder durch die Ankurbelung der Bcl-2-Proteinexpression selbst (CUCONATI und WHITE, 2002; HAY und KANNOURAKIS, 2002). Während das Humane Herpes Virus 8 (CHENG et al., 1997) oder das Virus der Afrikanischen Schweinepest (NEILAN et al., 1993) über Bcl-2-Homologe verfügen, bewirken HIV und EBV die Überexpression des Bcl-2-Proteins in der infizierten Zelle (HENDERSON et al., 1991; ZAULI et al., 1993).

Die Untersuchung der Expression des Bcl-2 zeigte in den Zellen, die mit dem cp Biotyp infiziert waren, keinerlei Veränderungen, während die Expression infolge der Infektion mit ncp BVD-Virus deutlich anstieg. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für das CSF-Virus gezeigt (BENSAUDE et al., 2002). Im Gegensatz dazu ergaben neuere Untersuchungen eine Inhibition der Bcl-2-Expression infolge der Infektion mit dem cp BVD-Virus NADL (JORDAN et al., 2002). Da diese Ergebnisse auf der Infektion der permanenten Zelllinie MDBK basieren, ist eine zellspezifische Reaktion denkbar. Dementsprechend ist die Fortführung der Studien in MDBK-Zellen mit ncp BVD-Viren sinnvoll.

Das Kernenzym p53 ist ein positiver Transkriptionsaktivator des proapoptotischen Bax und kann im Gegenzug die Transkription des antiapoptotischen Bcl-2 negativ beeinflussen. Die verstärkte Bcl-2-Expression war jedoch nicht auf eine Veränderung der p53-Expression zurückzuführen, wie sie u.a. für die durch Tamoxifen induzierte Apoptose in Brustkrebszellen beschrieben wurde (ZHANG et al., 1999). Auch andere Signaltransduktionskaskaden wie der *ras-pathway* können eine Bcl-2-Überexpression bewirken (KINOSHITA et al., 1995). Auch eine Bcl-2-Regulation über Proteinkinase C (PKC) und Proteinkinase A (PKA) wurde bereits diskutiert (ITANO et al., 1996).

Die vergleichende Untersuchung des bcl-2-mRNA-Niveaus in Zellen, die mit BVD-Virus infiziert waren, zeigte, unabhängig vom Biotyp, im Gegensatz zur Infektion mit BHV-1 keinerlei signifikante Änderung (DEVIREDDY und JONES, 1999). Hier ging das Auftreten des durch die Virusinfektion induzierten CPE mit einem deutlichen Abfall der bcl-2-RNA-Kopienzahl einher. In Anbetracht dessen, dass das mRNA-Niveau infolge der Infektion unbeeinflusst zu sein schien, könnte auch eine post-transkriptionale Wirkung, die zu einer Stabilisierung der mRNA führt, die Ursache für die Überexpression sein (BERNEY et al., 2000).

Die virusinduzierte Überexpression des Bcl-2-Proteins spielt u.a. im Verlauf der HIV-Infektion eine Rolle (HENDERSON et al., 1991). Sie stellt den Wegbereiter für die Etablierung einer persistierenden Infektion dar. Um die potentielle Schutzfunktion des Bcl-2 im Verlauf der Infektion mit ncp BVD-Virus näher zu charakterisieren, wurde zunächst das murine Bcl-2-Protein stabil in in bovinen Zellen exprimiert und charakterisiert. Die Bcl-2-Überexpression bewirkte einen partiellen Schutz gegenüber der Infektion mit cp BVD-Virus. Das Auftreten eines CPE konnte um 72 h hinausgezögert

werden. Eine Zellpassage konnte jedoch nicht durchgeführt werden. Sie führte innerhalb von 24 h zur Ausprägung eines CPE. Das bcl-2-mRNA-Niveau blieb wie in den nicht transfizierten Kontrollen unbeeinflusst. Der partielle Schutz vor der Apoptoseinduktion infolge einer Infektion mit cp BVD-Virus könnte in der noch nicht geklärten Komplexität der Inhibitionsstrategie begründet liegen. So wurde beispielsweise für das HCV die virusinduzierte Überexpression des Bcl-X<sub>L</sub>, einem weiteren anti-apoptotisch aktiven Protein der Bcl-2-Familie postuliert (OTSUKA et al., 2002). Obwohl die These aufgrund abweichender Ergebnisse kontrovers diskutiert wird, scheint eine Untersuchung weiterer Familienmitglieder sinnvoll. Zur Prüfung der Schutzfunktion des Bcl-2 im Verlauf der Infektion mit ncp BVD-Virus wäre auch der Einsatz der Antisense-Technologie denkbar (GUINNESS et al., 2000). Mit Hilfe von spezifischen zellpermeablen Oligonucleotiden kann die Transkription einzelner Gene selektiv inhibiert werden, so dass die Expression des korrespondierenden Proteins unterbleibt. Auf diese Weise könnte untersucht werden, ob die Bcl-2-Inhibition in einer Apoptoseinduktion durch das eigentliche ncp BVD-Virus resultiert.

Ein weiterer interessanter Ansatz wäre die Suche nach einem potentiellen vBcl-2 im BVD-Virusgenom. Sie wird allerdings durch die geringe Sequenzhomologie der bisher bekannten vBcl-2 im Bereich der Domänen BH1-4 erschwert. Diese sind im Vergleich zu den zellulären Mitgliedern der Bcl-2-Familie auf der Ebene der Primärstruktur nur in geringem Maße konserviert (AFONSO et al., 1996; CUCONATI und WHITE, 2002). Lediglich konservierte  $\alpha$ -Helix-Strukturen könnten Hinweise auf ein BVD-viruscodiertes vBcl-2 geben.

## 6 Zusammenfassung

### Untersuchung der molekularen Mechanismen der Zellschädigungen durch das cytopathogene Bovine Virusdiarrhoe Virus.

Das Bovine Virusdiarrhoe Virus (BVD-Virus) zählt innerhalb der Familie *Flaviviridae* zum Genus *Pestivirus*. Anhand seines Verhaltens in einer permissiven Zellkultur können zwei verschiedene Biotypen unterschieden werden. Während die Infektion mit dem nichtcytopathogenen (ncp) Biotyp keinerlei morphologisch sichtbare Veränderungen in der Zellkultur hervorruft, führt die Infektion mit dem cytopathogenen (cp) Biotyp zur Ausprägung eines cytopathischen Effektes (CPE), der letztlich im Zelltod durch Apoptose mündet. Das Verhalten der beiden Biotypen spiegelt sich auch *in vivo* in persistent mit dem ncp Biotyp infizierten Rindern wieder. Nur diese Tiere können im Verlauf ihres Lebens an der als *mucosal disease* bezeichneten, stets tödlich verlaufenden Form der BVD-Virusinfektion erkranken. Aus diesen Tieren werden beide Biotypen isoliert, wobei die Läsionen und Ulzerationen im Magen-Darm-Trakt stets mit dem Auftreten des cp BVD-Virus korrelieren. Über die Prozesse, die zur Zellzerstörung im Verlauf der Infektion mit dem cp BVD-Virus führen, ist bisher nur wenig bekannt, weshalb in der vorliegenden Arbeit zunächst die potentiell apoptotische Wirkung des Glykoproteins E<sup>ms</sup> auf bovine Zellen untersucht wurde. Hierfür wurde das E<sup>ms</sup>-Gen unterschiedlicher BVD-Virusstämme mittels RT-PCR amplifiziert, in ein eukaryotisches Expressionssystem kloniert und im Anschluss an eine Sequenzanalyse in bovinen Zellen exprimiert. Die rekombinanten Proteine zeigten eine vergleichbare Lokalisation wie während des Infektionsverlaufs, waren jedoch trotz Verwendung entsprechender Signalsequenzen nicht im Zellkulturüberstand nachweisbar. Die stabile Expression des E<sup>ms</sup> aus dem cp BVD-Virusstamm NADL zeigte, dass zellgebundenes E<sup>ms</sup> allein nicht in der Lage ist, Apoptose zu induzieren.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Apoptoseinduktion *in vitro* über den *intrinsic pathway* mit den Mitochondrien als Schlüsselorganellen verläuft. Sie resultiert in der Bildung des Apoptosoms, bestehend aus Cytochrom c, Apaf-1 und Procaspase-9 und damit in der Initiation der Caspasenkaskade.

Die vorliegenden Ergebnisse deuten zudem darauf hin, dass das ncp BVD-Virus über eine Strategie verfügt, diesen Prozess aktiv zu inhibieren, um die Etablierung einer persistierenden Infektion zu gewährleisten. Eine wichtige Funktion scheint hier dem antiapoptotisch wirkenden Bcl-2-Protein zuzukommen, welches im Verlauf der Infektion überexprimiert wurde und direkt auf der Ebene der Mitochondrien wirkt. Zellen, die das Bcl-2 konstitutiv überexprimierten, waren jedoch nicht vollständig vor der Apoptoseinduktion geschützt, was für die Komplexität der Inhibitionsstrategie spricht.

Weitere Untersuchungen, wie beispielsweise der Einsatz von antisense-Oligonucleotiden zur spezifischen Inhibition der bcl-2-Transkription und die Suche nach weiteren potentiell beteiligten Mitgliedern der Bcl-2-Familie, sind jedoch erforderlich, um einen umfassenderen Eindruck von den molekularen Mechanismen der ncp BVD-virusbedingten Apoptoseinhibition zu bekommen.

Die vorliegenden Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass der Apoptoseinhibition während der Infektion mit ncp BVD-Virus *in vitro* ein in hohem Maße regulierter Mechanismus zugrunde liegt, während die Apoptoseinduktion in Zellen, die mit cp BVD-Virus infiziert wurden, eine evolutionäre Sackgasse ist.



## Literaturverzeichnis

- ADAMS, J. M. und S. CORY (1998): The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **281**, 1322-6.
- AFONSO, C. L., J. G. NEIL, G. F. KUTISH und D. L. ROCK (1996): An african swine fever virus Bcl-2 homolog, 5-HL, suppresses apoptotic cell death. *J Virol* **70**, 4858-4863.
- ANTONSSON, B. und J. C. MARTINO (2000): The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res* **256**, 50-7.
- ARNOULT, D., P. PARONE, J. C. MARTINO, B. ANTONSSON, J. ESTAQUIER und J. C. AMEISEN (2002): Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor occurs downstream of cytochrome c release in response to several proapoptotic stimuli. *J Cell Biol* **159**, 923-9.
- AYYAVOO, V., A. MAHBOUBI, S. MAHALINGAM, R. RAMALINGAM und S. KUDCHODKAR (1997): HIV-1 VPr suppresses immune activation and apoptosis through regulation of nuclear factor kappa B. *Nat Med* **3**, 1117-1123.
- BAKER, J. A., C. J. YORK, J. H. GILLESPIE und G. B. MITCHELL (1954): Virus diarrhea in cattle. *Am. J. Vet. Res.* **15**, 525-531.
- BALACHANDRAN, S., C. N. KIM, W. C. YEH, T. W. MAK, K. BHALLA und G. N. BARBER (1998): Activation of the dsRNA-dependent protein kinase, PKR, induces apoptosis through FADD-mediated death signaling. *Embo J* **17**, 6888-902.
- BARINAGA, M. (1998): Is apoptosis key in Alzheimer's disease? *Science* **281**, 1302-1303.
- BARRY, M. und G. MCFADDEN (1998): Apoptosis regulators from DNA viruses. *Curr Opin Immunol* **10**, 422-30.
- BAUER, M. K., A. SCHUBERT, O. ROCKS und S. GRIMM (1999): Adenine nucleotide translocase-1, a component of the permeability transition pore, can dominantly induce apoptosis. *J Cell Biol* **147**, 1493-502.
- BENNETT, M., K. MACDONALD, S. W. CHAN, J. P. LUZIO, R. SIMARI und P. WEISSBERG (1998): Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science* **282**, 290-3.
- BENSAUDE, E., P. WAKELEY, C. PARDIEU, D. SWEETMAN, T. W. DREW, T. WILEMAN und P. POWELL (2002): Interactions between classical swine fever virus and host cells. 5th ESVV Pestivirus Symposium, Cambridge, UK

- BERNEY, C. R., S. R. DOWNING, J. L. YANG, P. J. RUSSELL und P. J. CROWE (2000): Evidence for post-transcriptional down-regulation of the apoptosis-related gene bcl-2 in human colorectal cancer. *J Pathol* **191**, 15-20.
- BERRIDGE, M. J., P. LIPP und M. D. BOOTMAN (2000): The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 11-21.
- BISHOP, J. M. (1982): Retroviruses and cancer genes. *Adv Cancer Res* **37**, 1-32.
- BOLIN, S. R. (1993): Primary postnatal infection with bovine viral diarrhea virus (acute BVDV). Proceedings of the Second Symposium on Pestiviruses, Annecy
- BOLIN, S. R., V. MOENNIG, N. E. KELSO GOURKLEY und J. F. RIDPATH (1988): Monoclonal antibodies with neutralizing activity segregate isolates of bovine viral diarrhea virus into groups. *Arch Virol* **99**, 117-123.
- BOLIN, S. R. und J. F. RIDPATH (1992): Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhea viruses in calves. *Am J Vet Res* **53**, 2157-2163.
- BORNER, C. (2003): The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol* **39**, 615-47.
- BRAITHWAITE, A. W. und I. A. RUSSELL (2001): Induction of cell death by adenoviruses. *Apoptosis* **6**, 359-370.
- BRUSCHKE, C. J., M. M. HULST, R. J. MOORMANN, P. A. VAN RIJN und J. T. VAN OIRSCHOT (1997): Glycoprotein Erns of pestiviruses induces apoptosis in lymphocytes of several species. *J Virol* **71**, 6692-6.
- BUMP, N. J., M. C. HACKETT und M. HAGUNIN (1993): Inhibition of the ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic p35 protein. *Science* **269**, 1885-1888.
- CARRASCOSA, A. L., M. J. BUSTOS, M. L. NOGAL, G. GONZALEZ DE BUITRAGO und Y. REVILLA (2002): Apoptosis induced in an early step of African swine fever virus entry into vero cells does not require virus replication. *Virology* **294**, 372-82.
- CASARO, A. P. E., J. W. KENDRICK und P. C. KENNEDY (1971): Response of the bovine fetus to bovine viral diarrhea-mucosal disease virus. *Am J Vet Res* **32**, 1543-1562.
- CHAN, S. L. und M. P. MATTSON (1999): Caspase and calpain substrates: roles in synaptic plasticity and cell death. PG - 167-90. *J Neurosci Res* **58**, 167-90.
- CHAN, W. Y., K. K. CHEUNG, J. O. SCHORGE, L. W. HUANG, W. R. WELCH, D. A. BELL, R. S. BERKOWITZ und S. C. MOK (2000): Bcl-2 and p53 protein expression, apoptosis, and p53 mutation in human epithelial ovarian cancers. *Am J Pathol* **156**, 409-17.

- CHANG, H. W., J. C. WATSON und B. L. JACOBS (1992): The E3L gene of vaccinia virus encodes an inhibitor of the interferon -induced, double-stranded RNA-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 4825-4829.
- CHENG, E. H., J. NICHOLAS, D. S. BELLOWS, G. S. HAYWARD, H. G. GUO, M. S. REITZ und J. M. HARDWICK (1997): A Bcl-2 homolog encoded by Kaposi sarcoma-associated virus, human herpesvirus 8, inhibits apoptosis but does not heterodimerize with Bax or Bak. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 690-4.
- CHINNAIYAN, A. M. (1999): The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia* **1**, 5-15.
- COHEN, G. M. (1997): Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* **326**, 1-16.
- COLLETT, M. S., D. K. ANDERSON und E. RETZEL (1988a): Comparisons of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus with members of the flaviviridae. *J Gen Virol* **69**, 2637-43.
- COLLETT, M. S., R. LARSON, S. K. BELZER und E. RETZEL (1988b): Proteins encoded by bovine viral diarrhea virus: the genomic organization of a pestivirus. *Virology* **165**, 200-8.
- COLLETT, M. S., M. WISKERCHEN, E. WELNIAK und S. K. BELZER (1991): Bovine viral diarrhea virus genomic organization. *Arch Virol Suppl* **3**, 19-27.
- CREAGH, E. M. und S. J. MARTIN (2001): Caspases: cellular demolition experts. *Biochem Soc Trans* **29**, 696-702.
- CRESS, W. D. und J. R. NEVINS (1996): Use of the E2F transcription factor by DNA tumor virus regulatory proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* **208**, 63-78.
- CROMPTON, M. (1999): The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* **341**, 233-49.
- CROMPTON, M., S. VIRJI und J. M. WARD (1998): Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *Eur J Biochem* **258**, 729-35.
- CUCONATI, A. und E. WHITE (2002): Viral homologs of BCL-2: role of apoptosis in the regulation of virus infection. *Genes Dev* **16**, 2465-78.
- DEISS, L. P., H. GALINKA, H. BERISSI, O. COHEN und A. KIMCHI (1996): Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon-gamma, Fas/APO-1 and TNF-alpha. *Embo J* **15**, 3861-70.
- DEPRAETERE, V. und P. GOLSTEIN (1998): Dismantling in cell death: molecular mechanisms and relationship to caspase activation. *Scand J Immunol* **47**, 523-31.
- DEVIREDDY, L. R. und C. J. JONES (1999): Activation of caspases and p53 by bovine herpesvirus 1 infection results in programmed cell death and efficient virus release. *J Virol* **73**, 3778-88.

- DONIS, R. O., W. V. CORAPI und E. J. DUBOVI (1988): Neutralizing monoclonal antibodies to bovine diarrhea virus bind to the 56K to 58K glycoprotein. *J Gen Virol* **69**, 77-86.
- DONIS, R. O. und E. J. DUBOVI (1987): Characterization of bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus-specific proteins in bovine cells. *J Gen Virol* **68**, 1597-605.
- ELBERS, K., N. TAUTZ, P. BECHER, D. STOLL, T. RUMENAPF und H. J. THIEL (1996): Processing in the pestivirus E2-NS2 region: identification of p7 and E2p7. *J Virol* **70**, 4131-4135.
- ELEOUE, J. F., S. CHILMONCZYK, L. BESNARDEAU und H. LAUDE (1998): Transmissible gastroenteritis coronavirus induces programmed cell death in infected cells through a caspase-dependent pathway. *J Virol* **72**, 4918-24.
- ENARI, M., R. V. TALANIAN, W. W. WONG und S. NAGATA (1996): Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis. *Nature* **380**, 723-6.
- ESKES, R., B. ANTONSSON, A. OSEN-SAND, S. MONTESSUIT, C. RICHTER, R. SADOUL, G. MAZZEI, A. NICHOLS und J. C. MARTINOU (1998): Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg<sup>2+</sup> ions. *J Cell Biol* **143**, 217-24.
- EVERETT, H. und G. MCFADDEN (1999): Apoptosis: an innate immune response to virus infection. *Trends Microbiol* **7**, 160-5.
- FERRI, K. F. und G. KROEMER (2001a): Mitochondria--the suicide organelles. *Bioessays* **23**, 111-5.
- FERRI, K. F. und G. KROEMER (2001b): Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* **3**, E255-63.
- FINDLEY, H. W., L. GU, A. M. YEAGER und M. ZHOU (1997): Expression and regulation of Bcl-2, Bcl-xl, and Bax correlate with p53 status and sensitivity to apoptosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **89**, 2986-93.
- FINLAY, C. A., P. W. HINDS und A. J. LEVINE (1989): The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* **57**, 1083-93.
- FONTAINE, E., F. ICHAS und P. BERNARDI (1998): A ubiquinone-binding site regulates the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem* **273**, 25734-40.
- FREY, H. R., U. FLEBBE und B. LIESS (1996): Prävalenz und klinische Symptomatik persistierender BVD-Virusinfektionen in Rinderbeständen Niedersachsens. *Prakt. Tierarzt* **77**, 49-52.

- FREY, H. R. und B. LIESS (1971): Vermehrungskinetik und Verwendbarkeit eines stark zytopathogenen BVD-MD-Virusstammes für diagnostische Untersuchungen mit der Mikrotitermethode. *Zentralbl. Veterinärmed.* **18**, 61-71.
- FRINK, S., B. GRUMMER, J. F. POHLENZ und E. M. LIEBLER-TENORIO (2002): Changes in Distribution and Numbers of CD4+ and CD8+ T-lymphocytes in Lymphoid Tissues and Intestinal Mucosa in the Early Phase of Experimentally Induced Early Onset Mucosal Disease in Cattle. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **49**, 476-83.
- FRITZEMEIER, J., L. HAAS, E. LIEBLER, V. MOENNIG und I. GREISER-WILKE (1997): The development of early vs. late onset mucosal disease is a consequence of two different pathogenic mechanisms. *Arch Virol* **142**, 1335-1350.
- GILLESPIE, J. H., J. A. BAKER und K. MCENTEE (1960): A cytopathogenic strain of virus diarrhea virus. *Cornell Vet.* **50**, 73-79.
- GOH, P. Y., Y. J. TAN, S. P. LIM, S. G. LIM, Y. H. TAN und W. J. HONG (2001): The hepatitis C virus core protein interacts with NS5A and activates its caspase-mediated proteolytic cleavage. *Virology* **290**, 224-36.
- GOPING, I. S., A. GROSS, J. N. LAVOIE, M. NGUYEN, R. JEMMERSON, K. ROTH, S. J. KORSMEYER und G. C. SHORE (1998): Regulated targeting of BAX to mitochondria. *J Cell Biol* **143**, 207-15.
- GOTTLOB, K., M. FULCO, M. LEVRERO und A. GRAESSMANN (1998): The hepatitis B virus HBx protein inhibits caspase 3 activity. *J Biol Chem* **273**, 33347-53.
- GREEN, D. R. und G. P. AMARANTE-MENDES (1998): The point of no return: mitochondria, caspases, and the commitment to cell death. *Results Probl Cell Differ* **24**, 45-61.
- GREEN, D. R. und J. C. REED (1998): Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**, 1309-12.
- GREISER-WILKE, I., K. E. DITTMAR, B. LIESS und V. MOENNIG (1992): Heterogeneous expression of the non-structural protein p80/p125 in cells infected with different pestiviruses. *J Gen Virol* **73**, 977-980.
- GREISER-WILKE, I., L. HAAS, K. E. DITTMAR, B. LIESS und V. MOENNIG (1993): RNA insertions and gene duplications in the nonstructural protein p125 region of pestivirus strains in vitro and in vivo. *Virology* **193**, 977-980.
- GROSS, A., J. M. MCDONNELL und S. J. KORSMEYER (1999): BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* **13**, 1899-911.
- GRUMMER, B. (1999a): Einfluss der Infektion mit dem Virus der Bovinen Virusdiarrhoe auf die Wirtszelle. Hannover, Tierärztl. Hochschule, Dissertation

- GRUMMER, B. (1999b): persönliche Mitteilung.
- GRUMMER, B., M. BEER, E. LIEBLER-TENORIO und I. GREISER-WILKE (2001): Localization of viral proteins in cells infected with bovine viral diarrhoea virus. PG - 2597-605. *J Gen Virol* **82**, 2597-605.
- GRUMMER, B., S. BENDFELDT und I. GREISER-WILKE (2002a): Apoptosis inhibitors delay the cytopathic effect of bovine viral diarrhoea virus (BVDV). *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **49**, 298-303.
- GRUMMER, B., S. BENDFELDT, B. WAGNER und I. GREISER-WILKE (2002b): Induction of the intrinsic apoptotic pathway in cells infected with cytopathic bovine virus diarrhoea virus. *Virus Res* **90**, 143-53.
- GRUMMER, B. und I. GREISER-WILKE (1998): Apoptose bei Virusinfektionen der Tiere - Eine Übersicht. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* **105**, 29-31.
- GRUMMER, B., V. MOENNIG und I. GREISER-WILKE (1998): Cytopathogenic bovine viral diarrhoea viruses induce apoptosis in bovine cell cultures. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* **105**, 29-31.
- GUINNESS, M. E., J. L. KENNEY, M. REISS und L. J. (2000): Bcl-2-Antisense Oligonucleotide Therapy of Epstein Barr Virus-induced Lymphoproliferative Disease in Severe Combined Immunodeficient Mice. *Cancer Res* **60**, 5534-5538.
- GURTU, V., S. R. KAIN und G. ZHANG (1997): Fluorometric and colorimetric detection of caspase activity associated with apoptosis. *Anal Biochem* **251**, 98-102.
- HACKI, J., L. EGGER, L. MONNEY, S. CONUS, T. ROSSE, I. FELLAY und C. BORNER (2000): Apoptotic crosstalk between the endoplasmic reticulum and mitochondria controlled by Bcl-2. *Oncogene* **19**, 2286-95.
- HAFEZ, S. M. (1967): Charakterisierung und Darstellung des Virus der "Virusdiarrhoe-Mucosal Disease" des Rindes (VD-Virus). Hannover, Tierärztl. Hochschule, Dissertation
- HAHM, B., D. S. HAN, S. H. BACK, O. K. SONG, M. J. CHO, C. J. KIM, K. SHIMOTOHNO und S. K. JANG (1995): NS3-4A of hepatitis C virus is a chymotrypsin-like protease. *J Virol* **69**, 2534-9.
- HALESTRAP, A. P., E. DORAN, J. P. GILLESPIE und A. O'TOOLE (2000): Mitochondria and cell death. *Biochem Soc Trans* **28**, 170-7.
- HARBOUR, J. W., D. C. DEAN, M. GRELL, P. H. KRAMMER und P. SCHEURICH (2000): Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis Segregation of APO-1/Fas antigen- and tumor necrosis factor receptor-mediated apoptosis. *Nat Cell Biol* **2**, E65-7.

- HARPIN, S., S. M. ELAHI, E. CORNAGLIA, R. H. YOLKEN und Y. ELAZHARY (1995): The 5'-untranslated region sequence of a potential new genotype of bovine viral diarrhoea virus. *Arch Virol* **140**, 1285-90.
- HAY, S. und G. KANNOURAKIS (2002): A time to kill: viral manipulation of the cell death program. *J Gen Virol* **83**, 1547-64.
- HAYWARD, W. S., B. G. NEEL und S. M. ASTRIN (1981): Activation of a cellular onc gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukemia. *Nature* **290**, 475-80.
- HEGDE, R., S. M. SRINIVASULA, M. AHMAD, T. FERNANDES-ALNEMRI und E. S. ALNEMRI (1998): Bcl-2, a BH3-containing mouse protein that interacts with Bcl-2 and Bcl-xL, is a potent death agonist. *J Biol Chem* **273**, 7783-6.
- HEINRICH, M., M. WICKEL, W. SCHNEIDER-BRACHERT, C. SANDBERG, J. GAHR, R. SCHWANDNER, T. WEBER, P. SAFTIG, C. PETERS, J. BRUNNER, M. KRONKE und S. SCHUTZE (1999): Cathepsin D targeted by acid sphingomyelinase-derived ceramide. *Embo J* **18**, 5252-63.
- HENDERSON, S., M. ROWE, C. GREGORY, D. CROOM-CARTER, F. WANG, R. LONGNECKER, E. KIEFF und A. RICKINSON (1991): Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell* **65**, 1107-15.
- HERION, D. und J. H. HOOFNAGLE (1997): The interferon sensitivity determining region of hepatitis c virus isolates are not the same. *Hepatology* **25**, 769-771.
- HIHARA, H., N. NOMURA, K. TSUKAMOTO und R. ISHIZAKI (1998): Rearrangement of c-myc gene in rapidly induced avian lymphoid leukemia tumors. *J Vet Med Sci* **60**, 395-7.
- HOFF, H. S. und R. O. DONIS (1997): Induction of apoptosis and cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by cytopathic bovine viral diarrhoea virus infection. *Virus Res* **49**, 101-13.
- HULST, M. M. und R. J. MOORMANN (1994): Glycoprotein E2 of classical swine fever: expression in insect cells and identification as a ribonuclease. *Virology* **200**, 558-565.
- HULST, M. M., F. E. PANOTO, A. HOEKMAN, H. G. VAN GENNIP und R. J. MOORMANN (1998): Inactivation of the RNase activity of glycoprotein E(rns) of classical swine fever virus results in a cytopathogenic virus. PG - 151-7. *J Virol* **72**, 151-7.
- HULST, M. M., H. G. VAN GENNIP und R. J. MOORMANN (2000): Passage of classical swine fever virus in cultured swine kidney cells selects virus variants that bind to heparan sulfate due to a single amino acid change in envelope protein E(rns). PG - 9553-61. *J Virol* **74**, 9553-61.

- IQBAL, M., H. FLICK-SMITH und J. W. MCCAULEY (2000): Interactions of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein E(rns) with cell surface glycosaminoglycans. PG - 451-9. *J Gen Virol* **81**, 451-9.
- ISHIDO, S., T. FUJITA und H. HOTTA (1998): Complex formation of NS5B with NS3 and NS4A proteins of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun* **244**, 35-40.
- ISHITANI, R., H. TAJIMA, H. TAKATA, K. TSUCHIYA, T. KUWAE, M. YAMADA, H. TAKAHASHI, N. A. TATTON und N. KATSUBE (2003): Proapoptotic protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: a possible site of action of antiapoptotic drugs. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **27**, 291-301.
- ITANO, Y., A. ITO, T. UEHARA und Y. NOMURA (1996): Regulation of Bcl-2 protein expression in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: positive and negative effects of protein kinases C and A, respectively. *J Neurochem* **67**, 131-7.
- JACOBS, B. L. und J. O. LANGLAND (1996): When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA. *Virology* **219**, 339-49.
- JACOTOT, E., L. RAVAGNAN, M. LOEFFLER, K. F. FERRI, H. L. VIEIRA, N. ZAMZAMI, P. COSTANTINI, S. DRUILLENNEC, J. HOEBEKE, J. P. BRIAND, T. IRINOPOULOU, E. DAUGAS, S. A. SUSIN, D. COINTE, Z. H. XIE, J. C. REED, B. P. ROQUES und G. KROEMER (2000): The HIV-1 viral protein R induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore. *J Exp Med* **191**, 33-46.
- JAHNZ, M. (1999): Hannover, Tierärztl. Hochschule, Diplomarbeit
- JORDAN, R., L. WANG, T. M. GRACZYK, T. M. BLOCK und P. R. ROMANO (2002): Replication of a cytopathic strain of bovine viral diarrhoea virus activates PERK and induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in MDBK cells. *J Virol* **76**, 9588-9599.
- KAERBER, G. (1931): Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch. exp. Pathol. Pharmacol.* **162**, 480.
- KAUFMAN, R. J. (1999): Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev* **13**, 1211-33.
- KERR, J. F., A. H. WYLLIE und A. R. CURRIE (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239-57.



- KINOSHITA, T., T. YOKOTA, K. ARAI und A. MIYAJIMA (1995): Regulation of Bcl-2 expression by oncogenic Ras protein in hematopoietic cells. *Oncogene* **10**, 2207-12.
- KLEIN, S. (1999): Nachweis der Caspase-Aktivitäten in mit Bovinem Virusdiarrhoe Virus infizierten Zellen. Hannover, Tierärztl. Hochschule, Diplomarbeit
- KLUCK, R. M., E. BOSSY-WETZEL, D. R. GREEN und D. D. NEWMAYER (1997): The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* **275**, 1132-6.
- KNIPPERS, R. (1995): Molekulare Genetik, Georg Thieme Verlag, 6. Auflage.
- KO, L. J. und C. PRIVES (1996): p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* **10**, 1054-1072.
- KOHLER, C., S. ORRENIUS und B. ZHIVOTOVSKY (2002): Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. *J Immunol Methods* **265**, 97-110.
- KORSMEYER, S. J. (1999): BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res* **59**, 1693s-1700s.
- KRAJCSI, P. und W. S. WOLD (1998): Inhibition of tumor necrosis factor and interferon responses by DNA viruses. *Semin. Cell Dev. Biol.* **9**, 351-358.
- KROEMER, G., B. DALLAPORTA und M. RESCHE-RIGON (1998): The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* **60**, 619-42.
- KUMMERER, B. M. und G. MEYERS (2000a): Correlation between point mutations in NS2 and the viability and cytopathogenicity of Bovine viral diarrhea virus strain Oregon analyzed with an infectious cDNA clone. *J Virol* **74**, 390-400.
- KUMMERER, B. M. und G. MEYERS (2000b): Correlation between point mutations in NS2 and the viability and cytopathogenicity of Bovine viral diarrhea virus strain Oregon analyzed with an infectious cDNA clone. PG - 390-400. *J Virol* **74**, 390-400.
- LAEMMLI, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- LAMBOT, M., E. HANON, C. LECOMTE, C. HAMERS, J. J. LETESSON und P. P. PASTORET (1998): Bovine viral diarrhoea virus induces apoptosis in blood mononuclear cells by a mechanism largely dependent on monocytes. *J Gen Virol* **79**, 1745-9.
- LANE, D. P. (1992): Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **358**, 15-6.
- LEE, K. M. und J. H. GILLESPIE (1957): Propagation of virus diarrhea virus in cattle in tissue culture. *Am. J. Vet. Res.* **18**, 952-953.
- LEIST, M. und M. JAATTELA (2001): Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 589-98.

- LEVINE, A. J., J. MOMAND und C. A. FINLAY (1991): The p53 tumour suppressor gene. *Nature* **351**, 453-6.
- LI, P., D. NIJHAWAN, I. BUDIHardJO, S. M. SRINIVASULA, M. AHMAD, E. S. ALNEMRI und X. WANG (1997): Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**, 479-89.
- LI, W., X. YUAN, G. NORDGREN, H. DALEN, G. M. DUBOWCHIK, R. A. FIRESTONE und U. T. BRUNK (2000): Induction of cell death by the lysosomotropic detergent MSDH. *FEBS Lett* **470**, 35-9.
- LIEBLER, E., J. WASCHBÜSCH, J. POHLENZ, V. MOENNIG und B. LIESS (1991): Distribution of antigen of noncytopathogenic and cytopathogenic bovine viral diarrhea virus biotypes in the intestinal tract of calves following experimental production of mucosal disease. *Arch Virol*, [Suppl.3], 109.124.
- LIEBLER-TENORIO, E., I. GREISER-WILKE und J. POHLENZ (1997): Organ and tissue distribution of the antigen of the cytopathogenic bovine virus diarrhea virus in the early and advanced phase of experimental mucosal disease. *Arch Virol* **142**, 1613-1634.
- LIEBLER-TENORIO, E., J. F. POHLENZ und G. N. WOODE (1995): Die hämorrhagische Verlaufsform der akuten bovinen Virusdiarrhoe: Literaturübersicht und Fallbericht. *Tierärztl. Praxis* **23**, 18-25.
- LIESS, B. (1967): Die ätiologische Abgrenzung selbständiger Virusinfektionen, insbesondere der Virusdiarrhoe -Mucosal Disease, im sogenannten "Mucosal Disease-Komplex" bei Rindern. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* **74**, 46-49.
- LIESS, B. (1987): Viruspersistenz - ein Schlüsselphänomen der BVD-Virusinfektion. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* **95**, 264-266.
- LIESS, B., H. R. FREY, H. KITTSTEINER, F. BAUMANN und W. NEUMANN (1974): Beobachtungen und Untersuchungen über die "Mucosal Disease" des Rindes - einer immunbiologisch erklärbaren Spätform der BVD-MD-Virusinfektion mit Kriterien einer "slow virus infection"? *Dtsch Tierarztl Wochenschr* **81**, 477-500.
- LIESS, B., H. R. FREY, S. ORBAN und S. M. HAFEZ (1987): Häufigkeit des Auftretens persistierender BVD-Virusinfektionen und ihre Auswirkungen in der Rinderpopulation. *Dtsch. tierärztl. Wochenschr.* **94**, 583-585.
- LIESS, B., S. ORBAN, H. R. FREY, G. TRAUTWEIN, W. WIEFEL und H. BLINDOW (1984): Studies on transplacental transmissibility of a bovine virus diarrhea (BVD) vaccine virus in cattle: II. Inoculation of pregnant cows without detectable neutralizing antibodies to BVD virus 90-229 days before parturition (51st to 190th day of gestation). *Zentralbl. Veterinärmed.* **31**, 669-681.

- LISS, B., S. REINECKE, G. SANDERS, I. GREISER-WILKE und V. MOENNIG (1993): An immunoplaque assay distinguishing between cytopathogenic and noncytopathogenic biotypes of bovine viral diarrhea virus. *J Vet Med* **40**, 89-96.
- LIU, J. J., M. L. WONG und T. J. CHANG (1998a): The recombinant nucleocapsid protein of classical swine fever virus can act as a transcriptional regulator. *Virus Res* **53**, 75-80.
- LIU, J. J., M. L. WONG, P. F. CHEN und T. J. CHANG (1998b): Cloning, expression and sequence analysis of the classical swine fever virus nucleocapsid protein. *Virus Genes* **16**, 225-34.
- LUTZ, R. J. (2000): Role of the BH3 (Bcl-2 homology 3) domain in the regulation of apoptosis and Bcl-2-related proteins. *Biochem Soc Trans* **28**, 51-6.
- MACEN, J., A. TAKAHASHI, K. B. MOON, R. NATHANIEL, P. C. TURNER und R. W. MOYER (1998): Activation of caspases in pig kidney cells infected with wild-type and CrmA/SPI-2 mutants of cowpox and rabbitpox viruses. *J Virol* **72**, 3524-33.
- MARCU, K. B., S. A. BOSSONE und A. J. PATEL (1992): myc function and regulation. *Annu Rev Biochem* **61**, 809-60.
- MARUSAWA, H., M. HIJIKATA, T. CHIBA und K. SHIMOTOHNO (1999): Hepatitis C virus core protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis via NF-kappaB activation. *J Virol* **73**, 4713-20.
- MAURER, K., V. MOENNIG, H. J. THIEL und T. RUMENAPF (2000): Identifizierung von CD46 als zellulärer Rezeptor für bovine Pestiviren. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Wien
- MCCONKEY, D. J. und S. ORRENIUS (1996): The role of calcium in the regulation of apoptosis. *J Leukoc Biol* **59**, 775-83.
- MCFADDEN, G., A. LALANI, H. EVERETT, P. NASH und X. XU (1998): Virus-encoded receptors for cytokines and chemokines. *Semin. Cell Dev. Biol.* **9**, 359-368.
- MEYERS, G., T. RUMENAPF, N. TAUTZ, E. J. DUBOVI und H. J. THIEL (1991a): Insertion of cellular sequences in the genome of bovine viral diarrhea virus. *Arch Virol Suppl* **3**, 133-42.
- MEYERS, G., T. RUMENAPF und H. J. THIEL (1989): Ubiquitin in togaviruses. *Nature* **341**, 491.
- MEYERS, G., N. TAUTZ, E. J. DUBOVI und H. J. THIEL (1991b): Viral cytopathogenicity correlated with integration of ubiquitin-coding sequences. *Virology* **180**, 602-16.

- MIRKES, P. E. und S. A. LITTLE (2000): Cytochrome c release from mitochondria of early postimplantation murine embryos exposed to 4-hydroperoxycyclophosphamide, heat shock, and staurosporine. *Toxicol Appl Pharmacol* **162**, 197-206.
- MIURA, M., R. M. FRIEDLANDER und J. YUAN (1995): Tumor necrosis factor-induced apoptosis is mediated by a CrmA-sensitive cell death pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 8318-22.
- MIYASHITA, T., S. KRAJEWSKI, M. KRAJEWSKA, H. G. WANG, H. K. LIN, D. A. LIEBERMANN, B. HOFFMAN und J. C. REED (1994): Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* **9**, 1799-805.
- MIYASHITA, T. und J. C. REED (1995): Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **80**, 293-9.
- MOENNIG, V. (1971): Untersuchungen über das Sedimentationsverhalten des Virus der Mucosal Disease-Virusdiarrhöe: Ein Beitrag zu seiner Klassifizierung als Mitglied der Togavirusgruppe. Hannover, Tierärztl. Hochschule, Dissertation
- MOENNIG, V., H. R. FREY, E. LIEBLER, J. POHLENZ und B. LIESS (1990): Reproduction of mucosal disease with cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus selected in vitro. *Vet Rec* **127**, 200-3.
- MOSER, C., P. STETTLER, J. D. TRATSCHIN und M. A. HOFMANN (1999): Cytopathogenic and noncytopathogenic RNA replicons of classical swine fever virus. PG - 7787-94. *J Virol* **73**, 7787-94.
- MOZDZIAK, P. E., J. J. DIBNER und D. W. MCCOY (2003): Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression varies with age and nutrition status. *Nutrition* **19**, 438-40.
- MURAKAMI, S. (2001): Hepatitis B virus X protein: a multifunctional viral regulator. *J Gastroenterol* **36**, 651-60.
- MUZIO, M., A. M. CHINNAIYAN, F. C. KISCHKEL, K. O'ROURKE, A. SHEVCHENKO, J. NI, C. SCAFFIDI, J. D. BRETZ, M. ZHANG, R. GENTZ, M. MANN, P. H. KRAMMER, M. E. PETER und V. M. DIXIT (1996): FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell* **85**, 817-27.
- NAGATA, S. und P. GOLSTEIN (1995): The Fas death factor. *Science* **267**, 1449-56.
- NAKAGAWA, T. und J. YUAN (2000): Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol* **150**, 887-94.

- NAKAGAWA, T., H. ZHU, N. MORISHIMA, E. LI, J. XU, B. A. YANKNER und J. YUAN (2000): Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* **403**, 98-103.
- NAVA, V. E., A. ROSEN, M. A. VELIUONA, R. J. CLEM, B. LEVINE und J. M. HARDWICK (1998): Sindbis virus induces apoptosis through a caspase-dependent, CrmA-sensitive pathway. *J Virol* **72**, 452-9.
- NEDDERMANN, P., L. TOMEI, C. STEINKUHLER, P. GALLINARI, A. TRAMONTANO und R. DE FRANCESCO (1997): The nonstructural proteins of the hepatitis C virus: structure and functions. PG - 469-76. *Biol Chem* **378**, 469-76.
- NEIL, J. C., E. R. CAMERON und E. W. BAXTER (1997): p53 and tumour viruses: catching the guardian off-guard. *Trends Microbiol* **5**, 115-20.
- NEILAN, J. G., Z. LU, C. L. AFONSO, G. F. KUTISH, M. D. SUSSMAN und D. L. ROCK (1993): An African swine fever virus gene with similarity to the proto-oncogene bcl-2 and the Epstein-Barr virus gene BHRF1. *J Virol* **67**, 4391-4.
- NEVINS, J. R. (1992): E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* **258**, 424-9.
- NEVINS, J. R. (2001): The Rb/E2F pathway and cancer. *Hum Mol Genet* **10**, 699-703.
- NICHOLSON, D. W. und N. A. THORNBERRY (1997): Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* **22**, 299-306.
- NOTTENBURG, C., E. STUBBLEFIELD und H. E. VARMUS (1987): An aberrant avian leukosis virus provirus inserted downstream from the chicken c-myc coding sequence in a bursal lymphoma results from intrachromosomal recombination between two proviruses and deletion of cellular DNA. *J Virol* **61**, 1828-33.
- OLAFSON, P., A. D. MACCALLUM und F. H. FOX (1946): An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet.* **36**, 205-213.
- OLTVAI, Z. N., C. L. MILLIMAN und S. J. KORSMEYER (1993): Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**, 609-19.
- OTSUKA, M., N. KATO, H. TANIGUCHI, H. YOSHIDA, T. GOTO, Y. SHIRATORI und M. OMATA (2002): Hepatitis C virus core protein inhibits apoptosis via enhanced Bcl-xL expression. *Virology* **296**, 84-93.
- PATIL, C. und P. WALTER (2001): Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 349-55.

- PAYNE, G. S., J. M. BISHOP und H. E. VARMUS (1982): Multiple arrangements of viral DNA and an activated host oncogene in bursal lymphomas. *Nature* **295**, 209-14.
- PEREZ, D. und E. WHITE (1998): E1B 19K inhibits Fas-mediated apoptosis through FADD-dependent sequestration of FLICE. *J Cell Biol* **141**, 1255-66.
- PIECHACZYK, M., J. M. BLANCHARD, L. MARTY, C. DANI, F. PANABIÈRES, S. EL SABOUTY, P. FORT und P. JEANTEUR (1984): Post-transcriptional regulation of glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase gene expression in rat tissues. *Nucleic Acids Res* **12**, 6951-63.
- PRITCHARD, W. R. (1963): The bovine viral diarrhea-mucosal disease complex. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* **8**, 1-47.
- QI, F., J. F. RIDPATH, T. LEWIS, S. R. BOLIN und E. S. BERRY (1992): Analysis of the bovine viral diarrhea virus genome for possible cellular insertions. *Virology* **189**, 285-92.
- RAMSEY, F. K. und W. H. CHIVERS (1953): Mucosal disease of cattle. *North Am. Vet.* **34**, 629-633.
- RASPER, D. M., J. P. VAILLANCOURT, S. HADANO, V. M. HOUTZAGER, I. SEIDEN, S. L. KEEN, P. TAWA, S. XANTHOUDAKIS, J. NASIR, D. MARTINDALE, B. F. KOOP, E. P. PETERSON, N. A. THORNBERRY, J. HUANG, D. P. MACPHERSON, S. C. BLACK, F. HORNUNG, M. J. LENARDO, M. R. HAYDEN, S. ROY und D. W. NICHOLSON (1998): Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex. *Cell Death Differ* **5**, 271-88.
- RAY, R. B., R. STEELE, K. MEYER und R. RAY (1997): Transcriptional repression of p53 promoter by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem* **272**, 10983-6.
- RAZVI, E. S. und R. M. WELSH (1995): Apoptosis in viral infections. *Adv Virus Res* **45**, 1-60.
- REED, J. C., J. M. JURGENSMEIER und S. MATSUYAMA (1998a): Bcl-2 family proteins and mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1366**, 127-37.
- REED, K. E., A. E. GORBALENYA und C. M. RICE (1998b): The NS5A/NS5 proteins of viruses from three genera of the family flaviviridae are phosphorylated by associated serine/threonine kinases. *J Virol* **72**, 6199-206.
- RIDPATH, J. F., S. R. BOLIN und E. J. DUBOVI (1994): Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. *Virology* **205**, 66-74.

- RIPPO, M. R., F. MALISAN, L. RAVAGNAN, B. TOMASSINI, I. CONDO, P. COSTANTINI, S. A. SUSIN, A. RUFINI, M. TODARO, G. KROEMER und R. TESTI (2000a): GD3 ganglioside as an intracellular mediator of apoptosis. *Eur Cytokine Netw* **11**, 487-8.
- RIPPO, M. R., F. MALISAN, L. RAVAGNAN, B. TOMASSINI, I. CONDO, P. COSTANTINI, S. A. SUSIN, A. RUFINI, M. TODARO, G. KROEMER und R. TESTI (2000b): GD3 ganglioside directly targets mitochondria in a bcl-2-controlled fashion. *Faseb J* **14**, 2047-54.
- ROEDER, P. L. und T. W. DREW (1984): Mucosal disease of cattle: a late sequel to fetal infection. *Vet Rec* **114**, 309-313.
- ROEMER, K. und T. FRIEDMANN (1994): Mechanism of action of the p53 tumor suppressor and prospects for cancer genetherapy by reconstitution of p53 function. *Ann N Y Acad Sci* **716**, 265-280.
- RUMENAPF, T., G. UNGER, R. STRAUSS, G. MEYERS und H. J. THIEL (1993): Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. *J Virol* **67**, 3288-3294.
- SALI, D. L., R. INGRAM, M. WENDEL, D. GUPTA, C. MCNEMAR, A. TSARBOPOULOS, J. W. CHEN, Z. HONG, R. CHASE, C. RISANO, R. ZHANG, N. YAO, A. D. KWONG, L. RAMANATHAN, H. V. LE und P. C. WEBER (1998): Serine protease of hepatitis C virus expressed in insect cells as the NS3/4A complex. PG - 3392-401. *Biochemistry* **37**, 3392-401.
- SANGER, F., S. NICKLEN und A. R. COULSON (1976): DNA sequencing with chain-terminator inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.
- SCHENDEL, S. L., M. MONTAL und J. C. REED (1998): Bcl-2 family proteins as ion-channels. *Cell Death Differ* **5**, 372-80.
- SCHREIBER, M., K. RAJARATHNAM und G. MCFADDEN (1996): Myxoma virus T2 protein, a tumor necrosis factor (TNF) receptor homolog, is secreted as a monomer and dimer that each bind rabbit TNFalpha, but the dimer is a more potent TNF inhibitor. *J Biol Chem* **271**.
- SCHREIBER, M., L. SEDGER und G. MCFADDEN (1997): Distinct domains of M-T2, the myxoma virus tumor necrosis (TNF) factor homolog, mediate extracellular TNF binding and intracellular apoptosis inhibition. *J Virol* **71**, 2171-2781.
- SCHWEIZER, M. und E. PETERHANS (1999): Oxidative stress in cells infected with bovine viral diarrhoea virus: a crucial step in the induction of apoptosis. *J Gen Virol* **80**, 1147-55.
- SCHWEIZER, M. und E. PETERHANS (2001): Noncytopathic bovine viral diarrhea virus inhibits double-stranded RNA-induced apoptosis and interferon synthesis. *J Virol* **75**, 4692-8.

- SKULACHEV, V. P. (1998): Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Lett* **423**, 275-80.
- STARK, G. R., I. M. KERR, B. R. WILLIAMS, R. H. SILVERMAN und R. W. SCHREIBER (1998): How cells respond to interferons. *Ann Rev Biochem* **67**, 227-264.
- STARK, R., G. MEYERS, T. RUMENAPF und H. J. THIEL (1993): Processing of pestivirus polyprotein: cleavage site between autoprotease and nucleocapsid protein of classical swine fever virus. *J Virol* **67**, 7088-95.
- STARK, R., T. RUMENAPF und H. J. THIEL (1990): Genomic localization of hog cholera virus glycoproteins. *Virology* **174**, 286-289.
- SUMMERFIELD, A., S. M. KNOTIG und K. C. MCCULLOUGH (1998): Lymphocyte apoptosis during classical swine fever: implication of activation-induced cell death. *J Virol* **72**, 1853-1861.
- SUMMERFIELD, A., K. ZINGLE, S. INUMARU und K. C. MCCULLOUGH (2001): Induction of apoptosis in bone marrow neutrophil-lineage cells by classical swine fever virus. *J Gen Virol* **82**, 1309-18.
- SUNDARARAJAN, R., A. CUCONATI, D. NELSON und E. WHITE (2001): Tumor necrosis factor-alpha induces Bax-Bak interaction and apoptosis, which is inhibited by adenovirus E1B 19K. *J Biol Chem* **276**, 45120-7.
- SUSIN, S. A., N. ZAMZAMI und G. KROEMER (1998): Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim Biophys Acta* **1366**, 151-65.
- SUZUKI, M., R. J. YOULE und N. TJANDRA (2000): Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* **103**, 645-54.
- SZALAI, G., R. KRISHNAMURTHY und G. HAJNOCZKY (1999): Apoptosis driven by IP(3)-linked mitochondrial calcium signals. *Embo J* **18**, 6349-61.
- TALANIAN, R. V., C. QUINLAN, S. TRAUTZ, M. C. HACKETT, J. A. MANKOVICH, D. BANACH, T. GHAYUR, K. D. BRADY und W. W. WONG (1997): Substrate specificities of caspase family proteases. *J Biol Chem* **272**, 9677-82.
- TAMURA, J. K., P. WARRENER und M. S. COLLETT (1993): RNA-stimulated NTPase activity associated with the p80 protein of the pestivirus bovine viral diarrhea virus. *Virology* **193**, 1-10.
- TANJI, Y., M. HIJIKATA, S. SATOH, T. KANEKO und K. SHIMOTOHNO (1995): Hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS4A has versatile functions in viral protein processing. *PG - 1575-81. J Virol* **69**, 1575-81.
- TAUTZ, N., A. KAISER und H. J. THIEL (2000): NS3 serine protease of bovine viral diarrhea virus: characterization of active site residues, NS4A cofactor domain, and protease-cofactor interactions. *PG - 351-63. Virology* **273**, 351-63.



- TEICHMANN, U., E. M. LIEBLER-TENORIO und J. F. POHLENZ (2000): Ultrastructural changes in follicles of small-intestinal aggregated lymphoid nodules in early and advanced phases of experimentally induced mucosal diseases in calves. *Am J Vet Res* **61**, 174-82.
- TEWARI, M. und V. M. DIXIT (1995): Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. *J Biol Chem* **270**, 3255-3260.
- THOMPSON, C. B. (1995): Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456-62.
- THORNBERRY, N. A., E. P. PETERSON, J. J. ZHAO, A. D. HOWARD, P. R. GRIFFIN und K. T. CHAPMAN (1994): Inactivation of interleukin-1 beta converting enzyme by peptide (acyloxy) methyl ketones. *Biochemistry* **33**, 3934-3940.
- TIDD, D. M., D. G. SPILLER, C. M. BROUGHTON, L. C. NORBURY, R. E. CLARK und R. V. GILES (2000): Oligodeoxynucleotide 5mers containing a 5'-CpG induce apoptosis through a mitochondrial mechanism in T lymphocytic leukaemia cells. *Nucleic Acids Res* **28**, 2242-50.
- TRATSCHIN, J. D., C. MOSER, N. RUGGLI und M. A. HOFMANN (1998): Classical swine fever virus leader proteinase Npro is not required for viral replication in cell culture. *J Virol* **72**, 7681-4.
- TRICARICO, C., P. PINZANI, S. BIANCHI, M. PAGLIERANI, V. DISTANTE, M. PAZZAGLI, S. A. BUSTIN und C. ORLANDO (2002): Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Anal Biochem* **309**, 293-300.
- UNDERDAHL, N. R., O. D. GRACE und A. D. HORLEIN (1957): Cultivation in tissue culture of cytopathogenic agents from bovine MD. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **94**, 795-797.
- VAN REGENMORTAL, M. H. V., C. M. FAUQUET, D. H. L. BISHOP, E. CARSTENS, M. K. ESTES, S. LEMON, J. MANILOFF, M. A. MAYO, D. J. MCGEOCH, C. R. PRINGLE und R. WICKNER (2000): Virus Taxonomy. Clasification of viruses. Academic Press, New York.
- VANDER HEIDEN, M. G. und C. B. THOMPSON (1999): Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nat Cell Biol* **1**, E209-16.
- VASSILEV, V. B. und R. O. DONIS (2000): Bovine viral diarrhea virus induced apoptosis correlates with increased intracellular viral RNA accumulation. *Virus Res* **69**, 95-107.

- VILLA, P., S. H. KAUFMANN und W. C. EARNSHAW (1997): Caspases and caspase inhibitors. *Trends Biochem Sci* **22**, 388-93.
- WADA, I., S. IMAI, M. KAI, F. SAKANE und H. KANO (1995): Chaperone function of calreticulin when expressed in the endoplasmatic reticulum as the membrane-anchored and soluble forms. *J Biol Chem* **270**, 20298-20304.
- WANG, Y., B. ROSENSTEIN, S. GOLDWYN, X. ZHANG, M. LEBWOHL und H. WEI (1998): Differential regulation of P53 and Bcl-2 expression by ultraviolet A and B. *J Invest Dermatol* **111**, 380-4.
- WARRENER, P. und M. S. COLLETT (1995): Pestivirus NS3 (p80) possesses RNA helicase activity. *J Virol* **69**, 1720-1726.
- WARRILOW, D., W. B. LOTT, S. GREIVE und E. J. GOWANS (2000): Properties of the bovine viral diarrhoea virus replicase in extracts of infected MDBK cells. *Arch Virol* **145**, 2163-2171.
- WEILAND, E., R. STARK, B. HAAS, T. RUMENAPF, G. MEYERS und H. J. THIEL (1990): Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer. *J Virol* **64**, 3563-9.
- WENGELER, G. (1991): Family - Flaviviridae.
- IN R.I.B. FRANCKI, C. M. F., D.L.KNUDSEN U. F. BROWN (HRSG.), *Arch Virol* [Suppl 2], 228-229
- WIMAN, K. G. (1993): The retinoblastoma gene: role in cell cycle control and cell differentiation. *Faseb J* **7**, 841-5.
- WINDISCH, J. M., R. SCHNEIDER, R. STARK, E. WEILAND, G. MEYERS und H. J. THIEL (1996): RNase of classical swine fever virus: biochemical characterization and inhibition by virus-neutralizing monoclonal antibodies. *J Virol* **70**, 352-8.
- WISKERCHEN, M., S. K. BELZER und M. S. COLLETT (1991): Pestivirus gene expression: the first protein product of the bovine viral diarrhoea virus large open reading frame, p20, possesses proteolytic activity. *J Virol* **65**, 4508-14.
- WISKERCHEN, M. und M. S. COLLETT (1991): Pestivirus gene expression: protein p80 of bovine viral diarrhoea virus is a proteinase involved in polyprotein processing. *Virology* **184**, 341-50.
- WOLTER, K. G., Y. T. HSU, C. L. SMITH, A. NECHUSHTAN, X. G. XI und R. J. YOULE (1997): Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* **139**, 1281-92.
- WU, Y., J. W. MEHEW, C. A. HECKMAN, M. ARCINAS und L. M. BOXER (2001): Negative regulation of bcl-2 expression by p53 in hematopoietic cells. *Oncogene* **20**, 240-51.

- XUE, W. und H. C. MINOCHA (1996): Identification of bovine viral diarrhoea virus receptor in different cell types. *Vet Microbiol* **49**, 67-79.
- YONEDA, T., K. IMAIZUMI, K. OONO, D. YUI, F. GOMI, T. KATAYAMA und M. TOHYAMA (2001): Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J Biol Chem* **276**, 13935-40.
- ZAULI, G., D. GIBELLINI, D. MILANI, M. MAZZONI und P. BORGATTI (1993): Human immunodeficiency virus type 1 Tat protein protects lymphoid, epithelial and neuronal cell lines from death by apoptosis. *Cancer Res* **53**, 4481-4485.
- ZHANG, G., S. ALDRIDGE, M. C. CLARKE und J. W. MCCAULEY (1996): Cell death induced by cytopathic bovine viral diarrhoea virus is mediated by apoptosis. *J Gen Virol* **77**, 1677-81.
- ZHANG, G. J., I. KIMIJIMA, M. ONDA, M. KANNO, H. SATO, T. WATANABE, A. TSUCHIYA, R. ABE und S. TAKENOSHITA (1999): Tamoxifen-induced apoptosis in breast cancer cells relates to down-regulation of bcl-2, but not bax and bcl-X(L), without alteration of p53 protein levels. *Clin Cancer Res* **5**, 2971-7.



# **Anlagen**



## Der genetische Code

1. Position	2. Position				3. Position
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	STOP	STOP	A
	Leu	Ser	STOP	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

## Der ein-Buchstaben-Code der Aminosäuren

<b>A</b>	Ala	Alanin
<b>C</b>	Cys	Cystein
<b>D</b>	Asp	Asparaginsäure
<b>E</b>	Glu	Glutaminsäure
<b>F</b>	Phe	Phenylalanin
<b>G</b>	Gly	Glycin
<b>H</b>	His	Histidin
<b>I</b>	Ile	Isoleucin
<b>K</b>	Lys	Lysin
<b>L</b>	Leu	Leucin

<b>M</b>	Met	Methionin
<b>N</b>	Asn	Asparagin
<b>P</b>	Pro	Prolin
<b>Q</b>	Gln	Glutamin
<b>R</b>	Arg	Arginin
<b>S</b>	Ser	Serin
<b>T</b>	Thr	Threonin
<b>V</b>	Val	Valin
<b>W</b>	Trp	Tryptophan
<b>Y</b>	Tyr	Tyrosin

## Medien und Lösungen für die Zellkultur

### **EMEM (Eagle's Minimal Essential Medium)**

Pulvermedium	9,6 g	Invitrogen, Karlsruhe
NaHCO <sub>3</sub>	2,2 g	Merck, Darmstadt
Penicillin G	50 mg	Sigma, Deisenhofen
Streptomycinsulfat	60 mg	Sigma, Deisenhofen
Phenolrot	0,016 g	Merck, Darmstadt
Aqua bidest	ad 1000 ml	
Einstellung des pH durch CO <sub>2</sub> -Begasung auf 6,9		

### **DMEM (EMEM modifiziert nach Dulbecco und Freeman 1959)**

Pulvermedium	13,53 g	Serva, Heidelberg
NaHCO <sub>3</sub>	2,2 g	Merck, Darmstadt
Penicillin G	50 mg	Sigma, Deisenhofen
Streptomycinsulfat	60 mg	Sigma, Deisenhofen
Phenolrot	0,016 g	Merck, Darmstadt
Aqua bidest	ad 1000 ml	
Einstellung des pH durch CO <sub>2</sub> -Begasung auf 6,9		

### **PBS (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)**

NaCl	8,0 g	Merck, Darmstadt
KCl	0,2 g	Merck, Darmstadt
NaHPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	2,37 g	Merck, Darmstadt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g	Merck, Darmstadt
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,132	Merck, Darmstadt
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,1	Sigma, Deisenhofen
Aqua bidest	ad 1000 ml	
Einstellung des pH durch CO <sub>2</sub> -Begasung auf 7,0 bis 7,2		



**Einfrriermedium**

DMEM	70 ml	Serva, Heidelberg
DMSO	10 ml	Sigma, Deisenhofen
Serum	20 ml	

**Versen-Trypsin-Lösung (0,125 %)**

NaCl	8,0 g	Merck, Darmstadt
KCl	0,2 g	Merck, Darmstadt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g	Merck, Darmstadt
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	2,37 g	Merck, Darmstadt
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,132 g	Merck, Darmstadt
Trypsin (3 U / mg)	1,25 g	Serva, Heidelberg
EDTA (Versen)	1,25 g	Merck, Darmstadt
Penicillin G	50 mg	Sigma, Deisenhofen
Steptomycinsulfat	60 mg	Sigma, Deisenhofen
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,1 g	Sigma, Deisenhofen
Aqua bidest	ad 1000 ml	

Einstellung des pH mit 1 N NaOH auf 7,0

**Seren für die Zellkultur**

Rinderserum	Institut für Virologie, TiHo Hannover
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Hamburg

## Medien und Lösungen für Bakterien

### **LB-Festmedium (pH 7,0)**

Pepton	1 % (w/v)	Serva, Heidelberg
NaCl	1 % (w/v)	Sigma, Deisenhofen
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)	Invitrogen, Karlsruhe
Agar	2 %	Roth, Karlsruhe

Autoklavieren (20 min bei 120 °C), Lagerung bei 4 °C.

### **LB-Flüssigmedium (pH 7,0)**

Pepton	1 % (w/v)	Serva, Heidelberg
NaCl	1 % (w/v)	Sigma, Deisenhofen
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)	Invitrogen, Karlsruhe

Autoklavieren (20 min bei 120 °C), Lagerung bei 4 °C.

### **SOC-Flüssigmedium**

Trypton	2 % (w/v)	Serva, Heidelberg
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)	Invitrogen, Karlsruhe
NaCl	10 mM	Sigma, Deisenhofen
KCl	2,5 mM	Merck, Darmstadt
MgCl <sub>2</sub>	10 mM	Sigma, Deisenhofen
MgSO <sub>4</sub>	10 mM	Sigma, Deisenhofen
Glucose	20 mM	Sigma, Deisenhofen

pH-Wert: einstellen auf 7,0

Autoklavieren (20 min bei 120 °C), Lagerung bei 4 °C.

Glucose sterilfiltrieren und nach dem Autoklavieren zusetzen.

## Primersequenzen

In der PCR und in der Plasmidsequenzierung verwendete Primer. Sie von MWG Biotech (Ebersberg) bezogen und mit DEPC-Wasser auf eine Konzentration von 50 pmol / µl eingestellt. Die Restriktionsenzymchnittstellen sind kursiv, Start- bzw. Stopcodons fett markiert.

### Genombereich E<sup>rns</sup> mit Signalsequenz

-Fragmentgröße 735 bp, Ref. BVD-Virus NADL-

**E<sup>rns</sup>-S:** 5' AAA *AAG CTT ATG* GCA TTG TTG GCG TGG 3' (1142 – 1156)

**E<sup>rns</sup>-AS:** 5' GTA *GAT ATC CTA* AGC GTA TGC TCC AAA CCA 3' (1876 – 1859)

### Genombereich E<sup>rns</sup> ohne Signalsequenz

-Fragmentgröße 680 bp, Ref. BVD-Virus NADL-

**E<sup>rns</sup>-K-S:** 5' AAA *AAG CTT ATG* GAA AAC ATA ACA CAG TGG AAC 3' (1196 – 1216)

**E<sup>rns</sup>-AS:** 5' GTA *GAT ATC CTA* AGC GTA TGC TCC AAA CCA 3' (1876 – 1859)

### Genombereich E<sup>rns</sup> für IGκ leader-Signalsequenz

-Fragmentgröße 680 bp, Ref. BVD-Virus NADL-

**pSE<sup>rns</sup>-S:** 5' GTT *AAG CTT* GAA AAC ATA ACA CAG TGG AAC 3' (1196 – 1216)

**E<sup>rns</sup>-AS:** 5' GTA *GAT ATC CTA* AGC GTA TGC TCC AAA CCA 3' (1876 – 1859)

### Genombereich NS2-3 für die Biotypisierung

-Fragmentgröße ncp BVD-Virus: 402 bp, cp BVD-Virus: 720 bp; Ref. BVD-Virus NADL-

**BVD-2:** 5' GCA GAT TTT GAA GAA AGA CAC TA 3' (4934 – 4956)

**BVD-3:** 5' TTG GTG TGT GTA AGC CCA 3' (5605 – 5588)

### Genombereich GAPDH für die Kontrolle der verwendeten RNA-Konzentrationen

-Fragmentgröße: 250 bp, Ref. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)

**mGAPDH1:** 5' ACGACATACTCAGCACCAGCATCA 3'

**mGAPDH2:** 5' TGAAGGTCGGTGTGAACGGATTTG 3'

**Genombereich bcl-2**

-Fragmentgröße: 268 bp, Ref. bovines bcl-2

**bcl-2-S:** 5' GTC GCT ACC GTC GTG ACT T 3'**bcl-2-AS:** 5' CAG CCT CCG TTA TCC TGG A 3'**Sequenzierprimer****Seq T7:** 5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3'**Seq BGH:** 5' AGA AGG CAC AGT CGA GG 3'**Thermoprofile**

<b>Reverse Transkription</b>						
	Temp. [°C]	Zeit	Zyklen	dT [°C]	dt [s]	↗ [°C / s]
1.	70	∞				4
2.	70	5 min				4
3.	4	∞				4
4.	22	5 min				4
5.	37	15 min				4
6.	42	30 min				4
7.	99	5 min				4
8.	4	∞				4
Heizdeckel: 110 °C		Vorlauf ein		Dauer: 1 h 03 min		

<b>E<sup>rns</sup>-PCR</b>						
	Temp. [°C]	Zeit	Zyklen	dT [°C]	dt [s]	↗ [°C / s]
1.	94	∞				4
2.	94	1 min				4
3.	94	20 sec	} 30 x	0,5		4
4.	58	35 sec				
5.	72	1 min				4
6.	72	10 min				4
7.	4	∞				4
Heizdeckel: 110 °C		Vorlauf ein		Dauer: 1 h 30 min		

<b>bcl-2-PCR</b>						
	Temp. [°C]	Zeit	Zyklen	dT [°C]	dt [s]	↗ [°C / s]
1.	94	∞				4
2.	95	1 min				4
3.	95	1 min	} 25 x			4
4.	57	1 min				
5.	72	2 min				4
6.	72	7 min				4
7.	4	∞				4
Heizdeckel: 110 °C		Vorlauf ein		Dauer: 2 h 09 min 54 sec		

<b>Kolonie-PCR</b>						
	Temp. [°C]	Zeit	Zyklen	dT [°C]	dt [s]	↗ [°C / s]
1.	94	∞				4
2.	94	1 min				4
3.	94	20 sec	} 20 x			4
4.	58	35 sec				4
5.	72	1 min				4
6.	72	10 min				4
7.	4	∞				4
Heizdeckel: 110 °C		Vorlauf ein		Dauer: 58 min		

<b>BVD 2 / 3-PCR</b>						
	Temp. [°C]	Zeit	Zyklen	dT [°C]	dt [s]	↗ [°C / s]
1.	94	1 sec				4
2.	95	44 sec				4
3.	94	45 sec	} 35 x			4
4.	55	35 sec			2	2
5.	72	30 sec			5	4
6.	72	10 min				4
7.	4	∞				4
Heizdeckel: 110 °C		Vorlauf ein		Dauer: 3 h 30 min		

<b>GAPDH-PCR</b>						
	Temp. [°C]	Zeit	Zyklen	dT [°C]	dt [s]	↗ [°C / s]
1.	95	45 sec				2
2.	50	60 sec				2
3.	72	60 sec	} 35 x			2
4.	72	5 min				2
5.	4	∞				2
Heizdeckel: 110 °C		Vorlauf ein		Dauer: 2 h 45 min		

<b>bcl-2-real time-PCR</b>						
	Temp. [°C]	Zeit	Zyklen	dT [°C]	dt [s]	↗ [°C / s]
1.	50	30 min				
2.	95	15 min				
3.	95	15 sec	} 40 x			
4.	57 *	30 sec				
5.	72	30 sec				
6.	81 *	15 sec				
7.	95	1 min <sup>∞</sup>				
8.	55 ↑ *	30 sec	41 x			
* Datenerfassung				Dauer: 2 h 30 min		

## PCR-Mastermixansätze

### Reverse Transkription

Mastermix I:	5 x RT-Puffer	8 µl
	dNTP	8 µl (2 µM)
	DEPC-H <sub>2</sub> O	10 µl
	RNA	6 µl bzw. 3 µg
Mastermix II:	DTT	3,5 µl (8,75 µM)
	Hexamere	2,0 µl (0,01 µM)
	RNase-Inhibitor	0,5 µl (5 U)
	Reverse Transkriptase	2,0 µl (200 U)

### Kolonie-PCR

	<u>10 Ansätze</u>
20 x Tth-Puffer	5 µl
dNTP	8 µl (2 µM)
MgCl <sub>2</sub>	5 µl (100 µM)
Sense-Primer (25 pmol)	1 µl
Antisense-Primer (25 pmol)	1 µl
Tth-Polymerase	0,5 µl (5 U)
DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 100 µl

### E<sup>rns</sup>-PCR / bcl-2 / BVD 2 / 3-PCR

cDNA	10 µl
20 x Tth-Puffer	8 µl
dNTP	4 µl (1 µM)
MgCl <sub>2</sub>	2 µl (50 µM)
Sense-Primer (50 pmol)	1 µl
Antisense-Primer (50 pmol)	1 µl
Tth-Polymerase	0,25 µl (2,5 U)
DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 50 µl

**Bcl-2-real time-PCR**

cDNA	4 µl
Mastermix	25 µl
Sense-Primer (50 pmol)	1 µl
Antisense-Primer(50 pmol)	1 µl
ROX (1:500 in DEPC)	0,75 µl
DEPC	Ad 50 µl

**GAPDH-PCR**

cDNA	10 µl
10 x Tth-Puffer	5 µl
MgCl <sub>2</sub>	3 µl (75 µM)
Sense-Primer (50 pmol)	1 µl
Antisense-Primer (50 pmol)	1 µl
Tth-Polymerase 1 : 10	2 µl (2 U)
DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 50 µl

## **Reagenzien für die molekularbiologischen Arbeiten**

### **Reverse Transkription und PCR**

MMLV-Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
dNTPs	Roche, Mannheim
RNase-Inhibitor	Invitrogen, Karlsruhe
Hexamere	Invitrogen, Karlsruhe
Tth-Polymerase	Biozym, Hessisch Oldendorf
<i>Brilliant SYBR Green QPCR</i>	Stratagene, Amsterdam, NL

### **Restriktionsansätze und Ligationen**

EcoRV	Invitrogen, Karlsruhe
HindIII	Invitrogen, Karlsruhe
NheI	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
SfuI	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
XhoI	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
T4 Ligase	Invitrogen, Karlsruhe
DNA-Längenstandard	Roche, Mannheim

### **Kommerziell erhältliche Testsysteme**

<i>BCA Protein Detection-Kit</i>	Pierce, Rockford, USA
<i>PCR Purification-Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>Plasmid Purification Mini-Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>Plasmid Purification Midi-Kit</i>	Qiagen, Hilden
Sequenzier-Kit <i>AutoRead</i> <sup>TM</sup>	Amersham, Freiburg
<i>BM Chemiluminescence Blotting Substrate POD</i>	Roche, Mannheim
<i>Super Signal-Kit</i>	Pierce, Rockford, USA



## Puffer und Lösungen

### Agarosegelelektrophorese

TBE-Puffer (10 x konz.)	Tris	10,8 % (w/v)
	Borsäure	5,5 % (v/v)
	EDTA (pH 8,0)	0,02 % (w/v)
TAE-Puffer (10 x konz.)	Tris	4,844 % (w/v)
	Natriumacetat x 3 H <sub>2</sub> O	2,722 % (w/v)
	EDTA (pH 8,0)	0,744 % (v/v)
	pH mit konz. Essigsäure auf 8,0 einstellen	
Färbebad	Ethidiumbromid	50 µg
	TAE (1 x)	250 ml

### Enzymtests

2 x konz. Reaktionspuffer	Hepes	40 mM
	DTT	4 mM
	Glycerin	20 %

### FACS-Analyse

Waschmedium	BSA	1 %
	Natriumazid	0,1 %
	PBS	

### Immunfluoreszenz

Einbettmedium pH 8,5	Mowiol 4-88	12 % (w/v)
	Glycerin	30 % (w/v)
	1,4-Diazobicyclo-[2.2.2]-oktan (DABCO)	2,5 % (w/v)
	Tris/HCl	0,12 M

### Kernfärbung

DAPI-Lösung	4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	0,10 mg
	Aqua bidest	1,00 ml

**Plaueklonierung**

Nähragar	DMEM, doppelt konz.	93,00 ml
	Rinderserum	7,00 ml
	Aqua bidest	100,00 ml
	Agar noble	2,00 g
	Agar noble in Aqua bidest autoklavieren, auf 44 °C abkühlen lassen und mit 37 °C warmem DMEM und Rinderserum vermischen und zügig verarbeiten	

**Peroxidase Linked Assay**

AEC-Lösung	AEC in Dimethylformamid	0,66 % (w/v)
AEC-Puffer	Natriumacetat	0,05 M pH 5,0
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in Aqua bidest	3 % (v/v)

**Protease-Inhibitor**

<i>Complete</i> <sup>TM</sup> -Lösung	<i>Complete</i> <sup>TM</sup>	1 Tablette
	Aqua bidest	2 ml

**SDS-PAGE**

Ammoniumpersulfat-Lsg.	APS	1,00 g
	Aqua bidest	9,00 ml
Sammelgel	Acrylamid / Bisacrylamid 29 : 1	5 % (w/v)
	Tris pH 6,8	0,125 % (w/v)
	10 % SDS	0,1 % (w/v)
	APS	0,1 % (w/v)
	TEMED	0,02 % (v/v)
Trenngel	Acrylamid / Bisacrylamid 29 : 1	7,5 – 15 %
	Tris pH 8,8	0,375 % (w/v)
	10 % SDS	0,1 % (w/v)
	APS	0,1 % (w/v)
	TEMED	0,04 % (v/v)

Probenpuffer (2 x konz.)	Tris pH6,8	62,5 mM
	SDS	2,00 %
	Glycerin	10 %
	Phenolrot	0,01 %
	Bromphenolblau	0,01 %
	DTT	100 mM
Elektrodenpuffer (10 x konz.)	Glycin	1,92 M
	Tris	0,25 M
	SDS	1 %
	Aqua bidest	

### Sequenzierung von Plasmid-DNA

Sequenziergel-Lösung	Harnstoff	21,6 g
	Long Range Acrylamid	7,25 ml
	Aqua bidest	32 ml
	10 x TBE-Puffer	9,25 ml
	APS	330 µl
	TEMED	33 µl

### Western Blot

Anodenpuffer I pH 9,0	1 M Tris	300 ml
	Aqua bidest	500 ml
	Ethanol / Methanol	200 ml
Anodenpuffer II pH 7,4	1 M Tris	25 ml
	Aqua bidest	770 ml
	Ethanol / Methanol	200 ml
Kathodenpuffer pH 9,0	1 M Tris	25 ml
	Aqua bidest	770 ml
	Ethanol / Methanol	200 ml
	ε-Aminocapronsäure	5,25 g

TBS-Tween20	Tris-HCl	0,1 M
	NaCl	0,1 M
	Tween20	0,05 %
Block-Lösung	<i>blocking reagent</i>	1 %
	TBS-Tween20	

**Zellysispuffer**

RIPA-Puffer (1 x konz.)	NaCl	150 mM
	Nonidet P-40	1,0 %
	Natriumdesoxycholat	0,5 %
	SDS	0,1 %
	Tris pH 8,0	50 mM

**Sonstige Chemikalien**

$\epsilon$ -Aminocaprinsäure	Roth, Karlsruhe
Aceton	Merck, Darmstadt
Acrylamid / Bisacrylamid 29 : 1	Bio-Rad, München
Agar noble	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
DABCO	Sigma, Deisenhofen
DAPI	MoBiTec, Göttingen
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
DTT	Biozym, Hessisch Oldendorf
EDTA	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe

---

Ethidiumbromid	MoBiTec, Göttingen
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Jürgens, Hannover
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hepes	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
(Di)Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Mowiol-4-88	Calbiochem, Heidelberg
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdesoxycholat	Sigma, Deisenhofen
Neutralrot	Merck, Darmstadt
Nonidet P-40	Sigma, Deisenhofen
Phenolrot	Merck, Darmstadt
SDS	Roth, Karlsruhe
TEMED	Sigma, Deisenhofen
Tween20	Serva, Heidelberg
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt

## **Geräte und Gebrauchsgegenstände**

### **Agarosegelelektrophoresesystem**

<i>Mini Sub Cell</i>	Bio-Rad, München
<i>Wide Mini Sub Cell</i>	Bio-Rad, München
Spannungsquelle: <i>Power Supply</i>	Bio-Rad, München
Mikrowellengerät	Privileg
UV-Transilluminator	UVP, USA
Bildverarbeitungssystem	MWG, Ebersberg

### **Autoklaven**

Autoklav 17	Melag, Berlin
Typ A5	Webeco, Bad Schwartau

### **ELISA-Reader**

Spectra II	Tecan, Crailsheim
------------	-------------------

### **Entwicklermaschine**

<i>Konica SRX Medical Film Processor</i>	Konica Corporation, Taiwan
--	----------------------------

### **Elektroporationsgerät**

<i>Gene Pulser</i>	Bio-Rad, München
<i>Capacitance Extender</i>	Bio-Rad, München
<i>Pulse Controller</i>	Bio-Rad, München

### **FACS-Gerät**

FACScan	Beckton, Dickinson, Heidelberg
---------	--------------------------------

### **Filme**

Kodak BioMax	Amersham, Freiburg
--------------	--------------------

### **Glasgefäße**

Jürgens, Hannover

### **Glaspipetten**

Jürgens, Hannover

### **Heizblöcke**

---

<i>DIGI-BLOCK</i> <sup>TM</sup> $\gamma$	Lab Devices, Holliston, USA
DRI-BLOCK DB3	Techne, Cambridge, UK
<b>Inkubator</b>	
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Heraeus, Hanau
Schüttelinkubator	GFL, Burgwedel
Inkubator	Heraeus, Hanau
<b>Küvetten</b>	
Einmal-Halbmikroküvetten	Landgraf, Langenhagen
Quartz-Küvetten	Amersham, Freiburg
<b>Mikroskope</b>	
Inverses Mikroskop	Leitz, Wetzlar
Axiophot	Zeiss, Jena
<b>Mikrotiterplatten für Enzymtests und Proteinbestimmungen</b>	
	Nunc, Wiesbaden
<b>Pasteurpipetten aus Glas</b>	
	Jürgens, Hannover
<b>pH-Meter</b>	
	Jürgens, Hannover
<b>Petrischalen für Bakterienkulturen</b>	
	Greiner, Nürtingen
<b>Photometer</b>	
Ultraspec 2000	Amersham, Freiburg
<b>Pipetten</b>	
12-Kanal-Pipette	Brand
20, 100, 200, 1000 $\mu$ l	Eppendorf, Hamburg
	Abimed, Langenfeld
<b>Pipettenspitzen</b>	
	Bio-Rad, München
<b>Pipettierhilfen</b>	
Pipetman	Eppendorf, Hamburg

### **Reaktionsgefäße**

Volumen 0,5 ml	Jürgens, Hannover
Volumen 1,5 ml	Jürgens, Hannover

### **SDS-PAGE**

Mighty Small II SE 250- Gelkammern	Serva, Heidelberg
PVDF-Membran	Millipore
Power Supply	Biometra, Göttingen

### **Sicherheitswerkbänke**

NUAIRE™ Klasse 2	Nuaire, Plymouth, USA
------------------	-----------------------

### **Thermocycler**

<i>T personal Cycler</i>	Biometra, Göttingen
--------------------------	---------------------

### **Thomakammer**

Jürgens, Hannover

### **Trockenschrank (80 °C)**

Ehret, Emmendingen

### **Vortex**

Modell K-550-GE	Bender & Hobein, Zürich, CH
-----------------	-----------------------------

### **Waagen**

1213 MP	Sartorius, Göttingen
Analysenwaage, 1712 MP 8	Sartorius, Göttingen

### **Wasserbäder**

Typ MR 2002 (mit Magnetrührer)	Heidolph, Kehlheim
Typ 1003	GFL, Burgwedel

### **Zellkultursysteme**

Gewebekulturflaschen 50 ml	Greiner, Nürtingen
Gewebekulturflaschen 250 ml	Greiner, Nürtingen
Gewebekulturflaschen 162 ml	Nunc, Wiesbaden
96-Well-Platten	Costar, Bodenheim



---

24-Well-Platten	Greiner, Nürtingen
6-Well-Platten	Costar, Bodenheim
Gewebekulturröhrchen	Greiner, Nürtingen
Gewebekulturschalen 60 mm	Nunc, Wiesbaden
Gewebekulturschalen 100 mm	Greiner, Nürtingen
Kryogefäße 2 ml	Greiner, Nürtingen
<b>Zentrifugen</b>	
Biofuge <i>pico</i>	Heraeus, Hanau
Mikroliter-Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge Modell 28-70 mit Rotor SW41	Beckmann, München
Labofuge 400R	Heraeus, Hanau
<b>Zentrifugengefäße</b>	
Polyallomer für SW 41	Beckman, München
Zentrifugengläser	Jürgens, Hannover
Kunststoffgefäße 15 ml, 50 ml	Greiner, Nürtingen

## **Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge**

Erste Ergebnisse dieser Arbeit sind bereits vorab veröffentlicht worden:

GRUMMER, B., S. BENDFELDT und I. GREISER-WILKE (2002), Apoptosis inhibitors delay the cytopathic effect of bovine viral diarrhoea virus (BVDV). *J. Vet. Med.* **49**, 298-303

GRUMMER, B., S. BENDFELDT, B. WAGNER und I. GREISER-WILKE (2002), Induction of the intrinsic pathway in cells infected with cytopathic bovine virus diarrhoea virus (BVDV). *Virus Res.* 90 (1-2), 143-153

BENDFELDT, S., B. GRUMMER und I. GREISER-WILKE (2002), No caspase activity but overexpression of Bcl-2 after infection of bovine cell cultures with noncytopathic bovine virus diarrhoea virus. *Vet. Microbiol.* zur Publikation angenommen

### **Kongressbeiträge**

GRUMMER, B., S. BENDFELDT und I. GREISER-WILKE (2000) In: Tagungsbericht der Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie e.V. Wien, BVD-virusinduzierte Apoptose und die zentrale Rolle der Mitochondrien.

KLEIN, S., B. GRUMMER und I. GREISER-WILKE (2001) In: Tagungsbericht der Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie e.V. Dresden, Caspasenaktivierung in mit cytopathogenem Bovinem Virusdiarrhoe Virus infizierten Zellen.

BENDFELDT, S., B. GRUMMER und I. GREISER-WILKE (2002) In: Tagungsbericht der Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie e.V. Erlangen, Infection with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus results in an enhanced Bcl-2 expression.

BENDFELDT, S., B. GRUMMER und I. GREISER-WILKE (2002) Vortrag 5<sup>th</sup> Pestivirus Symposium European Society of Veterinary Virology Cambridge, UK, Bcl-2 is overexpressed in cells infected with noncytopathic bovine virus diarrhea virus.

## **Mein besonderer Dank gilt:**

**Frau Prof. Dr. I. Greiser-Wilke** für die Überlassung des Themas und die stets engagierte Betreuung und Unterstützung während der Durchführung dieser Arbeit;

**Herrn Prof. Dr. V. Moennig** für die freundliche Aufnahme am Institut für Virologie;

**Frau Dr. B. Grummer** für die jederzeit gewährte freundliche und fachliche Hilfe, sowie die Diskussionen und Anregungen. Sie waren mir eine große Hilfe.

**Frau I. Betsch, Frau F. Busse und Herrn D. Bente** für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung vieler Arbeitsschritte sowie ihre ständige Diskussionsbereitschaft;

**Frau Dr. A. Lührmann** aus dem Institut für funktionelle und angewandte Anatomie der MHH und **Frau Dr. B. Wagner**, zur Zeit Gastwissenschaftlerin am James A. Baker Institute, Cornell USA, für die Unterstützung bei der Durchführung der FACS-Analysen;

**Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern** des Instituts für Virologie für ihre Hilfsbereitschaft;

und letztlich insbesondere **Frau M. Koeller, Frau R. Neth und Herrn B. Wefers** für ihre freundliche Unterstützung, die gute Zusammenarbeit und die vielen fachlichen und persönlichen Gespräche.