

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Pestiviren	1
1.1.1 Eigenschaften und Funktion der Strukturproteine von Pestiviren	4
1.1.1.1 Glykoproteine E^{ns}, E1 und E2	4
1.1.1.2 Kapsid-Protein (Core)	5
1.2 Eigenschaften und Funktion des Core-Proteins anderer Mitglieder der Familie Flaviviridae	6
1.2.1 Hepatitis C Virus	6
1.2.2 Flaviviren	8
1.3 Zielsetzung der Arbeit	10
2 Material und Methoden	11
2.1 Material	11
2.1.1 Eukaryotische Zelllinien	11
2.1.2 Prokaryotische Zellen	11
2.1.3 Virusstämme	11
2.1.4 Antikörper	12
2.1.5 Enzyme	13
2.1.6 Chemikalien	13
2.1.7 Verbrauchsmaterialien	14
2.1.8 Geräte	14
2.2 Methoden	15
2.2.1 Zellkulturtechniken für Säugerzellen und Virusarbeiten	15
2.2.1.1 Medien und Puffer	15
2.2.1.2 Allgemeine Zellkulturarbeiten	16
2.2.1.3 Elektroporation von RNS in SK6-Zellen	17
2.2.1.4 Indirekter immunhistochemischer Nachweis	18
2.2.1.4.1 Indirekte Immunperoxidase	18
2.2.1.4.2 Protein Nachweis durch indirekte Immunfluoreszenz	18
2.2.1.4.2.1 Einbettungsmedium	20
2.2.1.4.2.2 Färbung von Zellkernen mit 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI)	20

2.2.1.5 Titration von Pestiviren	20
2.2.1.6 Bestimmung der Proteinkonzentration (BC-Mikroassay)	20
2.2.2 Herstellung monoklonaler Antikörper	21
2.2.2.1 Erzeugung rekombinanter Proteine	21
2.2.2.2 Immunisierung von Mäusen	22
2.2.2.3 Gewinnung und Ausplattierung von „Feeder“-Zellen	23
2.2.2.4 Gewinnung der Splenozyten (Milzzellen)	23
2.2.2.5 Bestimmung der Zellzahl	24
2.2.2.6 Fusion von Splenozyten und Myelomzellen	24
2.2.2.7 Selektion von Hybridomzellen	25
2.2.2.8 ELISA zum Screening von Hybridom Überständen	25
2.2.2.9 Screening von Hybridomzellen	27
2.2.2.10 Klonierung positiver Hybridome	27
2.2.2.11 Produktion von mAks	27
2.2.2.12 Isotypisierung der mAks mit einem kommerziellen vorgefertigten Test (ImmunoPure® Monoclonal Antibody Isotyping Kit I (HRP/ABTS))	28
2.2.2.13 Bestimmung der Epitope der anti Core-Protein mAks	28
2.2.3 Kolokalisierungsstudien	28
2.2.3.1 Kolokalisierung von Struktur- bzw. Nichtstrukturproteinen mit dem ER	28
2.2.3.2 Kolokalisierung des Core-Proteins mit den Mitochondrien	29
2.2.3.2.1 Färbung von Mitochondrien	30
2.2.3.3 Kolokalisierung des Core-Proteins mit „lipid droplets“	30
2.2.3.3.1 Färbung der „lipid droplets“ mit Red Oil O	30
2.2.3.4 Kolokalisierung des Core-Proteins mit „P-Bodies“	31
2.2.3.5 Kolokalisierung des Core-Proteins mit NS3	31
2.2.3.5.1 Direkte Markierung der mAks mit dem „Zenon® Mouse Labeling Kit“ (Fa. Pierce)	32
2.2.3.5.1.1 Reinigung von monoklonalen Antikörpern	32
2.2.3.6 Kolokalisierung des Core-Proteins mit NS5B	33
2.2.4 Protein-RNS Agarose Gel Bindungsassay	33
2.2.5 Proteinbiochemische Methoden	34
2.2.5.1 SDS-PAGE	34

2.2.5.2 Coomassie-Färbung	35
2.2.5.3 Immunoblot-Analyse von Proteinen (Western Blot)	36
2.2.5.4 Gewinnung von Virionen aus dem Überstand infizierter Zellkulturen	37
2.2.5.5 Präparation von Lysaten aus KSPV infizierten Zellen zur Western Blot Analyse	37
2.2.5.6 Präparation von Lysaten aus mit nzp7 NS5A-B transfizierten Zellen zur Western Blot Analyse	37
2.2.6 Molekularbiologische Methoden	38
2.2.6.1 Anzucht von Bakterien	38
2.2.6.2 Plasmidisolierung	38
2.2.6.3 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien	40
2.2.6.4 Isolierung von Gesamt-RNS durch RNeasy	41
2.2.6.5 Phenol/Chloroform Extraktion von DNS	41
2.2.6.6 Ethanolpräzipitation von DNS/RNS und Isopropanolpräzipitation von DNS	42
2.2.6.7 Quantifizierung von DNS/RNS-Proben	42
2.2.6.8 DNS- bzw. RNS-Agarose-Gelelektrophorese	43
2.2.6.9 Dephosphorylierung von DNS	44
2.2.6.10 Aufreinigung und Ligation von DNS-Fragmenten	44
2.2.6.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	45
2.2.6.12 Ortsgerichtete Mutagenese mittels „QuickChange TM Site-Directed Mutagenesis“ und Deletions-PCR	46
2.2.6.13 In vitro Transkription	48
2.2.6.13.1 Herstellung von Transkripten verschiedener Länge	49
2.2.6.14 Sequenzierung der DNS durch „Cycle-Sequencing“ mit Fluoreszenzfarbstoff-markiertem Primer	49
2.2.6.15 Elektrophorese in denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgelen	50
2.2.7 Klonierungen	52
2.2.7.1 Synthetische Oligonukleotide	52
2.2.7.2 Klonierung des Gens des KSPV Core-Proteins	53
2.2.7.2.1 Generierung der am 3'-Ende verkürzten Formen des KSPV Core-Protein Gens (pCore 6, pCore 8, pCore 11, pCore 14)	53

2.2.7.3 Generierung eines KSPV Gesamtklons mit einem Cystein an der Aminosäureposition 200 des Core-Proteins (pCore29)	54
2.2.7.4 Klonierung des Gens vom BVDV Core-Protein (p940)	54
2.2.7.4.1 Generierung der am 3'-Ende verkürzten Formen des BVDV Core-Protein Gens (pCore 24, pCore 26, pCore 27, pCore 28)	55
2.2.7.5 Klonierung des KSPV NSSB-Protein Gens (p1141)	55

3 Ergebnisse

3.1 Klonierung, Expression und Aufreinigung des Core-Proteins vom Virus der klassischen Schweinepest	56
3.1.1 Klonierung	56
3.1.2 Expression	58
3.1.3 Reinigung	60
3.2 Klonierung, Expression und Aufreinigung des BVDVncp7 Core-Proteins	61
3.2.1 Klonierung	61
3.2.2 Expression	61
3.2.3 Reinigung	62
3.3 Präparation monoklonaler Antikörper gegen das pestivirale Core-Protein	63
3.3.1 Immunisierung	63
3.3.2 Fusion von Splenozyten immunisierter Mäuse mit Myelomzellen	64
3.3.2.1 Gewinnung von Splenozyten (Milzzellen) zur Fusion	65
3.3.2.2 Fusion von Splenozyten und Myelomzellen	65
3.3.3 Etablierung eines Screeningsystems zur Identifizierung positiver Hybridome	65
3.3.4 „Screening“ von Hybridom-Überständen im ELISA, Selektion und Klonierung positiver Hybridome	66
3.3.4.1 „Screening“ der Fusionen von Splenozyten aus Mäusen, die mit KSPV Core-Protein immunisiert wurden	67
3.3.4.2 „Screening“ der Fusionen von Splenozyten aus Mäusen, die mit BVDV Core-Protein immunisiert wurden	67
3.3.5 Isotypisierung der gewonnenen monoklonalen Antikörper	67

3.4 Charakterisierung der anti Core-Protein mAks	68
3.4.1 Reaktion der mAks im Western Blot mit gereinigtem bakteriellen Core-Protein	68
3.4.2 Nachweis des Core-Proteins in Virionen von Pestiviren verschiedener Spezies im Western Blot mit den hergestellten monoklonalen Antikörpern	69
3.4.3 Epitop Lokalisierung der anti Core-Protein mAks	72
3.4.3.1 Epitop Lokalisierung von mAk GRS-C1 und GRS-C2	72
3.4.3.2 Epitop Lokalisierung der mAk GRS-C3, GRS-C4, GRS-C5, GRS-C6, GRS-C7 und GRS-C8	73
3.5 Charakterisierung des höheren Molekulargewichtproduktes des Core-Proteins vom Stamm 890 und vom Isolat Gi-4	74
3.5.1 Stabilität des Produktes in Anwesenheit reduzierender Reagenzien	75
3.5.2 Funktion der Homodimerisierung von Core	76
3.6 RNS bindende Aktivität des KSPV Alfort_{ii} Core-Proteins	77
3.6.1 Bindung des Core-Proteins an pestivirale RNS	78
3.6.2 Bindung des Core-Proteins an KSPV RNS Transkripte verschiedener Länge	79
3.6.3 Bindung des Core-Proteins an nicht pestivirale RNS	81
3.6.3.1 Bindung des Core-Proteins an RNS Homopolymeren	82
3.6.4 Bindung des Core-Proteins an dsRNS	83
3.7 Nachweis des Core-Proteins von Pestiviren mit indirekter Immunfluoreszenz	83
3.8 Kolokalisierungsstudien des Core-Proteins in infizierten Zellen mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie	86
3.8.1 Kolokalisierung vom KSPV Core-Protein mit dem ER Marker Protein-Disulfidisomerase (PDI)	86
3.8.1.1 Kolokalisierung der KSPV Strukturglykoproteine E^{ns}, E1 und E2 mit PDI	89
3.8.2 Kolokalisierung vom KSPV Core-Protein mit Mitochondrien	92
3.8.3 Kolokalisierung des Core-Proteins mit „RNA processing bodies (P-Bodies)“	93
3.8.4 Kolokalisierung des KSPV Core-Proteins mit „lipid droplets“ (LD)	94
3.8.5 Kolokalisierung des Core-Proteins mit den Bestandteilen des Replikationskomplexes NS3 und NS5B	95
3.8.5.1 Kolokalisierung des Core-Proteins mit NS3	96

3.8.5.2 Herstellung von mAk gegen das NS5B Protein von KSPV	97
3.8.5.2.1 Klonierung, Expression und Reinigung des KSPV Alfort_ü NS5B Proteins (RNS abhängige RNS Polymerase)	97
3.8.5.2.2 Immunisierung von Mäusen und Fusion von Lymphozyten mit Myelomzellen	97
3.8.5.2.3 „Screening“, Isolierung und Klonierung positiver Hybridome	98
3.8.5.2.5 Charakterisierung der gegen das NS5B hergestellten monoklonalen Antikörper GRS-Pol-1, -2, -3, -4, -5 und -6	98
3.8.5.2.5.1 Bestimmung des Subtyps der anti NS5B mAks	98
3.8.5.2.5.2 Western Blot Analyse der Hybridom-Überstände mit Zelllysaten von KSPV infizierten und BVDV NS5A-B transient exprimierenden Zellen	98
3.8.5.2.5.3 Detektion des NS5B Proteins KSPV infizierter Zellen in indirekter Immunfluoreszenz	100
3.8.5.3 Kolokalisierung des NS5B Proteins mit dem ER	101
3.8.5.4 Kolokalisierung des Core-Proteins mit NS5B	103
4 Diskussion	104
-	
4.1 Herstellung und Charakterisierung von mAk gegen das pestivirale Core-Protein und Nachweis des Core-Proteins in Virionen von Pestiviren verschiedener Spezies	104
4.2 Nachweis des Core-Proteins von Pestiviren verschiedener Spezies in infizierten Zellen, und Kolokalisierungsuntersuchungen mit Hilfe monoklonaler Antikörper	106
4.3 Charakterisierung der RNS bindenden Aktivität des Core Proteins	109
5 Zusammenfassung	113
6 Summary	114
7 Literatur	115