

Aus dem Institut für Virologie und Zellbiologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. Norbert Tautz

Alternative Konformationen des NS3/4A-Komplexes als molekularer Schalter zwischen RNA-Replikation und Virionmorphogenese



Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von

Danilo Dubrau
aus Cottbus

Lübeck 2017

1. Berichtstatter: Prof. Dr. Norbert Tautz

2. Berichtstatter: Prof. Dr. Lars Redecke

Tag der mündlichen Prüfung: 21.09.2017

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 21.09.2017

Erklärung

Ich versichere, dass ich die Dissertation ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Weder vorher noch gleichzeitig habe ich andernorts einen Zulassungsantrag gestellt oder diese Dissertation vorgelegt. Ich habe mich bisher noch keinem Promotionsverfahren unterzogen.

Danilo Dubrau

Teile dieser Arbeit wurden publiziert:

Dubrau, D., Tortorici, M.A., Rey, F.A., and Tautz, N. (2017). A positive-strand RNA virus uses alternative protein-protein interactions within a viral protease/cofactor complex to switch between RNA replication and virion morphogenesis. *PLoS Pathog* 13, e1006134.

Teile dieser Arbeit wurden präsentiert:

Schlotthauer F., **Dubrau D.**, und Tautz N. Mechanistic studies of NS2-3-independent virion morphogenesis in pestiviruses. 27. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie (GfV), Marburg 2017 (Vortrag)

Dubrau D., Tortorici M.A., Klemens O., Rey F., und Tautz N. The pestiviral NS4A kink domain is a dynamic regulator of RNA replication and virion morphogenesis. 26. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie (GfV), Münster 2016 (Poster)

Dubrau D., Tortorici M.A., Klemens O., Rey F., und Tautz N. The pestiviral NS4A kink domain is a dynamic regulator of RNA replication and virion morphogenesis. 22nd International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Strasbourg, France 2015 (Vortrag)

Dubrau D., Tortorici M.A., Klemens O., Rey F., und Tautz N. The pestiviral NS4A kink domain is a dynamic regulator of RNA replication and virion morphogenesis. International Symposium on Flaviviruses: Structure and Immunity, Vienna, Austria 2015 (Poster)

Dubrau D., Klemens O., Schwindt S., und Tautz N. Virion morphogenesis of BVDV and CSFV in absence of uncleaved non-structural protein 2-3. 25. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie (GfV), Bochum 2015 (Poster)

Meiner Ehefrau

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis.....	i
II. Abkürzungsverzeichnis.....	iv
1. Zusammenfassung/Summary	1
1.1 Zusammenfassung.....	1
1.2 Summary.....	3
2. Einleitung	5
2.1 Die Virusfamilie Flaviviridae	5
2.2 Pestiviren	6
2.2.1 Taxonomie.....	6
2.2.2 Grundlegende Eigenschaften von Pestiviren	7
2.2.3 Infektionen durch Pestiviren.....	8
2.3 Allgemeine Grundlagen zur Replikation von Pestiviren.....	9
2.3.1 Der pestivirale Replikationszyklus im Überblick.....	9
2.3.2 RNA-Genom und Polyproteinprozessierung	11
2.3.3 Virale Strukturproteine	13
2.3.4 Virale Nichtstrukturproteine.....	14
2.3.5 Die pestiviralen Proteine NS2, NS3 und NS4A und ihre Proteinkomplexe.....	17
2.3.6 Zytopathogenität bei Pestiviren.....	21
2.4 Virionmorphogenese bei Pestiviren im Vergleich zu Vertretern der Flaviviridae	24
2.5 Pestivirale Virionmorphogenese ohne ungespaltenes NS2-3	27
2.6 Zielsetzung dieser Arbeit.....	29
3. Material und Methoden	31
3.1 Material.....	31
3.1.1 Chemikalien.....	31
3.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	32
3.1.3 Geräte.....	32
3.1.4 Enzyme	33
3.1.5 Kits.....	34
3.1.6 Geräte.....	34
3.1.7 PCR Primer.....	35
3.1.8 Plasmide	37
3.1.9 E. coli Stämme.....	41
3.1.10 Eukaryontische Zelllinien.....	42

3.1.11	Verwendete Viren	42
3.1.12	Puffer und Lösungen	42
3.2	Methoden	44
3.2.1	Arbeiten mit DNA	44
3.2.1.1	<i>Transformation von Bakterien mittels Hitze-Schock</i>	44
3.2.1.2	<i>Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien</i>	44
3.2.1.3	<i>Midi-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien</i>	45
3.2.1.4	<i>DNA-Restriktionsanalysen (analytisch-, präparativ-, Linearisierung)</i>	45
3.2.1.5	<i>Agarosegel-Elektrophorese und Isolation von DNA-Fragmenten</i>	46
3.2.1.6	<i>Primer-Hybridisierung</i>	47
3.2.1.7	<i>DNA-Ligation</i>	47
3.2.1.8	<i>Phenol-/Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung von linearisierter Plasmid-DNA</i>	47
3.2.1.9	<i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i>	48
3.2.1.10	<i>pGEM[®]-T Klonierung</i>	49
3.2.1.11	<i>Gerichtete Mutagenese (QuikChange-PCR[™])</i>	49
3.2.1.12	<i>Sequenzierungen</i>	50
3.2.2	Arbeiten mit RNA	50
3.2.2.1	<i>In vitro Transkription</i>	50
3.2.3	Arbeiten mit Zellen	51
3.2.3.1	<i>Allgemeine Zellkulturtechniken</i>	51
3.2.3.2	<i>T7-Vaccinia-Expression in eukaryontischen Zellen</i>	52
3.2.3.3	<i>DNA-Transfektion von Plasmid-DNA in eukaryontischen Zellen mittels Polyethylenimin (PEI) oder Metafectene[®]</i>	52
3.2.3.4	<i>TEV-Protease (TEV^{pro}) Spaltungsassay</i>	53
3.2.3.5	<i>Elektroporation von MDBK- und SK6-Zellen</i>	54
3.2.3.6	<i>Luciferase-Assay</i>	55
3.2.3.7	<i>Infektion von MDBK-Zellen</i>	55
3.2.3.8	<i>Bestimmung des Virustiters von Zellkulturüberständen (Titration)</i>	56
3.2.3.9	<i>Immunfluoreszenzanalyse</i>	57
3.2.3.10	<i>Metabolische Markierung von Proteinen mit ³⁵S-Methionin und ³⁵S-Cystein</i>	57
3.2.3.11	<i>Trans-Komplementationsassay</i>	57
3.2.4	Arbeiten mit Proteinen	58
3.2.4.1	<i>SDS-PAGE</i>	58
3.2.4.2	<i>Western Blot (Tank-Blot)</i>	58
3.2.4.3	<i>Radioimmunpräzipitation</i>	59

4. Ergebnisse	61
4.1 <i>Die NS3 Aminosäure 132 ist an der Oberflächeninteraktion zwischen der NS3 Proteasedomäne und der NS4A Kink-Region beteiligt.....</i>	62
4.2 <i>Aminosäureaustausche an der Interaktionsfläche zwischen der NS3 Proteasedomäne und der NS4A Kink-Region führen zur Abschwächung dieser Interaktion</i>	65
4.3 <i>Alaninmutationen innerhalb der NS3/4A-Kink Interaktionsfläche zeigen keinen Einfluss auf die Polyproteinprozessierung</i>	69
4.4 <i>Die Abschwächung der NS3/4A-Kink Interaktion ist kritisch für die RNA-Replikation</i>	73
4.5 <i>In der NS2-3-unabhängigen Virionmorphogenese kann die Mutation 3/V132A durch die Mutationen L45A oder Y47A in der NS4A Kink-Region funktionell ersetzt werden.....</i>	78
4.6 <i>Trans-Komplementationsstudien zeigen, dass die replikations-inkompetente Doppelmutante NS4A/L45-Y47-AA funktionell in der NS2-3-unabhängigen Virionmorphogenese ist.....</i>	86
4.7 <i>Die Anwesenheit von NS2 im pestiviralen Verpackungskomplex NS2-3/4A moduliert die Interaktion zwischen der NS3 Proteasedomäne und der NS4A Kink-Region.....</i>	91
5. Diskussion	94
5.1 <i>Strukturbasierte Untersuchungen zur Oberflächeninteraktion zwischen der NS3 Proteasedomäne und ihrem Kofaktor deuten auf verschiedene, funktionell relevante Proteinkomplexfkonformationen hin.....</i>	95
5.2 <i>Bedeutung der NS3/4A-Kink Oberflächeninteraktion für die pestivirale RNA-Replikation und die NS2-3-unabhängige Virionmorphogenese</i>	100
5.3 <i>Ausblick.....</i>	109
6. Literaturverzeichnis.....	112
7. Danksagung.....	129

II. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	mikro (10 ⁻⁶)
A	Ampere (Einheit der Stromstärke), Adenosin (nt)
aa	„amino acids“, Aminosäuren
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BDV	Border Disease Virus
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
BVDV	„bovine viral diarrhea virus“, Virus der bovinen Virusdiarrhö
best.	bestimmt
bzw.	beziehungsweise
C	„core“, Kapsid- bzw. Nukleokapsidprotein
ca.	circa
cp	„cytopathogenic“, zytopathogen
cDNA	„copy-DNA“, zur RNA komplementäre DNA
CD	„cluster of differentiation“, Oberflächenmolekül bzw. -merkmal mit best. Funktion
CIP	„calf intestine phosphatase“, alkalische Phosphatase
CSFV	„classical swine fever virus“, Virus der klassischen Schweinepest
C-terminal	Carboxy-terminal
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Cy3	Cyanine 3
d.h.	das heißt
DI, DII, DIII	Domäne I, II, III
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecos Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
E	„envelope protein“; Hüllprotein in der Virusmembran
<i>E. coli</i>	Escherichia Coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMCV	Encephalomyocarditis Virus
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
F	Farad, Einheit der elektrischen Kapazität
g	Gramm; Erdbeschleunigung
G	Guanosin
h	Stunden
HCV	Hepatitis C-Virus
HF	„high fidelity“, Bezeichnung für Restriktionsenzyme
HSP	„heatshock protein“, Hitzeschockprotein
i.d.R.	In der Regel
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation

IRES	„internal ribosome entry site“, interne Ribosomeneintrittsstelle
Jiv	„J-domain protein interacting with viral protein“
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton, Einheit der Proteinmasse
l	Liter
LB	„lysogeny broth“, Medium zur Anzucht von <i>E. coli</i>
M	Molar
m	milli (10^{-3})
mAk	monoklonaler Antikörper
MD	„Mucosal Disease“
MDBK	„Madin Darby Bovine Kidney“-Zellen, Rindernierenfibroblasten
MEM	„Minimum Essential Media“
min	Minuten
mind.	mindestens
MOI	„multiplicity of infection“, Anzahl infektiöser Viren pro Zelle
mRNA	„messenger-RNA“
n	nano (10^{-9})
ncp	„non-cytopathogenic“, nicht-zytopathogen
NADL	„National Animal Disease Laboratory“
N ^{pro}	N-terminale Protease
NS	Nichtstrukturprotein
nt	Nukleotid
N-terminal	Amino-terminal
N-Terminus	Amino-Terminus
NTR	nichttranslatierte Region einer RNA
nzp	nicht zytopathogen
OD _x	optische Dichte bei „x“ nm Wellenlänge
ORF	„open reading frame“, offenes Leseraster
Osl	BVDV-1 Stamm Osloss
P	Phosphat
PBS	„phosphate buffered saline“, phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	„polymerase chain reaction“, Polymerase-Kettenreaktion
pe	„post electroporation“, nach Elektroporation
PFA	Paraformaldehyd
pi	„post infection“, nach der Infektion
PI	persistently infiziert
PS	Pferdeserum
QC	QuikChange [®] , Methode zur gerichteten DNA-Mutagenese
RIP	Radioimmunpräzipitation
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkription
s	Sekunden
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SDS	Sodiumdodecylsulfat, Natriumdodecylsulfat
SK6	„swine kidney“, Schweinenierenzellen
ssRNA	„single-stranded RNA“, Einzelstrang-RNA
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCID ₅₀	„tissue culture infectious dose ₅₀ “ – Dosis infektiöser Einheiten, bei der 50 % der Gewebekulturzellen infiziert werden

TEV	„tobacco etch virus“, Tabak Mosaik Virus
TEV ^{pro}	Protease des Tabak Mosaik Virus
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit); Uridin (nt)
u.a.	unter anderem
Ubi	Ubiquitin
usw.	und so weiter
UV	ultraviolette elektromagnetische Strahlung
V	Volt
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
vs.	„versus“, lat. für gegenübergestellt
v/v	Volumenprozent
W	Watt
w/v	Gewichtprozent
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel
Zn	Zink
z.T.	Zum Teil
ZPE	zytopathischer Effekt

1. Zusammenfassung/Summary

1.1 Zusammenfassung

RNA-Viren der Familie *Flaviviridae* kodieren ein Polyprotein, das durch zelluläre- und virale Proteasen in funktionelle Struktur- und Nichtstrukturproteine (NS-Proteine) gespalten wird. Letztere kommen nicht im Viruspartikel vor, sind aber kritisch für die virale RNA-Replikation und die Virionmorphogenese. Über die molekularen Details zur Beteiligung der Proteine an so fundamental verschiedenen Prozessen ist bisher wenig bekannt. Viren des Genus *Pestivirus* sind in der Regel für die Bildung infektiöser Virionen auf einen bislang nur partiell charakterisierten Komplex aus ungespaltenem NS2-3 mit NS4A (NS2-3/4A) und weiteren viralen sowie zellulären Komponenten angewiesen. Im Gegensatz dazu ist der NS3/4A-Komplex im Zusammenspiel mit NS4B, NS5A und NS5B sowie zellulären Faktoren essentiell für die RNA-Replikation und kann nicht für die Virusassemblierung genutzt werden. Dieses funktionelle Dogma konnte durch die Anpassung eines Pestivirus an einen NS2-3-unabhängigen Verpackungsmechanismus unter Beteiligung von NS2 und NS3/4A anstelle des NS2-3/4A-Komplexes widerlegt werden. Die Basis für diese funktionelle Adaptation sind zwei Aminosäureaustausche, die essentiell für diese NS2-3-unabhängige Virionmorphogenese sind: E440V in der NS2 Proteasedomäne sowie V132A in der NS3 Proteasedomäne. Die molekularen Details dieses alternativen Verpackungsmechanismus bei Pestiviren waren bisher nicht bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde der molekulare Mechanismus der NS2-3-unabhängigen Virionmorphogenese durch eine Kombination aus Struktur- und Funktionsanalysen untersucht. Aus der Kristallstruktur des pestiviralen NS3/4A-Komplexes ging hervor, dass die Aminosäure 132 an der Oberflächeninteraktion der NS3 Proteasedomäne mit der NS4A Kink-Region beteiligt ist, die zur Ausbildung einer bevorzugt kompakten NS3/4A-Komplexformation führt. Es wurde deutlich, dass Mutationen, die zu einer Abschwächung der NS3/4A-Kink Oberflächeninteraktion führen, in einer verstärkt offenen NS3/4A-Komplexkonformation resultieren. Die funktionelle Charakterisierung dieser beiden alternativen NS3/4A-Komplexkonformationen zeigte, dass die offene Konformation eine Grundvoraussetzung für die NS2-3-unabhängige Virionmorphogenese ist, während verstärkte Oberflächeninteraktionen zwischen NS3 und NS4A im geschlossenen NS3/4A-Komplex essentiell für die RNA-Replikation sind. *Trans*-Komplementationsstudien, in denen mit einer offenen Variante des NS3/4A-Komplexes Defekte in der NS2-3-unabhängigen Virusassemblierung funktionell komplementiert werden konnten, bestätigten die Verwendung von alternativen NS3/4A-Komplexkonformationen für die funktionell verschiedenen Prozesse der viralen RNA-Replikation und NS2-3-unabhängigen Virionmorphogenese.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit verdeutlichen, dass Positivstrang RNA-Viren alternative Konformationen von Proteinkomplexen und deren veränderte Protein-Protein-Interaktionen für die Prozesse der RNA-Replikation und der Virionmorphogenese nutzen. Diese Strategie ermöglicht einen koordinierten Ablauf der einzelnen Prozesse des viralen Lebenszyklus durch die Nutzung weniger, multifunktionaler viraler Proteine und eine effiziente Regulation dieser Schritte durch alternative Proteininteraktionen dieser viralen Proteine. Da viele Viren ähnliche Mechanismen nutzen, um ihren viralen Lebenszyklus zu regulieren, leistet die vorliegende Arbeit einen wichtigen Beitrag zum Verständnis des modularen Aufbaus und zur Multifunktionalität von viralen Proteinkomplexen.

1.2 Summary

Positive-strand RNA viruses of the *Flaviviridae* family express a single polyprotein which is processed by cellular and viral proteases into functional proteins. While the structural proteins are part of the virus particle, the nonstructural (NS) proteins form complexes capable of genome replication. A peculiarity of the *Flaviviridae* is the essential role of NS-proteins in virion formation besides serving pivotal functions during RNA replication. So far, little is known about the molecular details how the NS proteins can function in such fundamentally different processes. Generally, virion morphogenesis of pestiviruses depends on an ill-defined protein-complex composed of uncleaved NS2-3 and NS4A (NS2-3/4A) that acts in concert with other viral and cellular proteins. In contrast, the NS3/4A-complex in conjunction with NS4B, NS5A, NS5B and other cellular proteins is required for RNA replication but is not functional in virus assembly. Recently, this functional dogma was challenged by the adaptation of a pestivirus to a NS2-3-independent packaging mechanism involving NS2 and NS3/4A instead of the NS2-3/4A complex. For this NS2-3 independent virion morphogenesis two amino acid exchanges are the basis for this functional adaptation: E440V in the NS2 protease domain as well as V132A in the NS3 protease domain. The molecular details of this alternative packaging mechanism in pestiviruses have not been characterized, so far.

In the present work, the molecular mechanism of NS2-3-independent virion morphogenesis was investigated by a combination of structural and functional analyzes. The crystal structure of a pestiviral NS3/4A-complex showed that the amino acid 132 is involved in the surface interaction of the NS3 protease domain with the NS4A-kink region, which leads to the formation of a preferably compact NS3/4A-complex. It could be demonstrated, that mutations which lead to a reduced surface interaction between NS3 and NS4A-kink region result in a preferred open NS3/4A complex conformation. The functional characterization of these two alternative NS3/4A-complex conformations showed that the open conformation is a prerequisite for NS2-3-independent virion morphogenesis, while enhanced surface interactions between NS3 and NS4A-kink region in the closed NS3/4A-complex are pivotal for RNA replication. Thus, it was proposed that two alternative variants of NS3/4A-complexes exist in pestivirus infected cells each representing a basic building block required for either RNA replication or virion morphogenesis. *Trans*-complementation studies in which defects in NS2-3-independent virion morphogenesis could be functionally rescued with an open variant of the NS3/4A-complex confirmed the use of alternative conformations of NS3/4A-complexes for the functionally different processes of viral RNA replication and NS2-3-independent virion morphogenesis.

Taken together the present study demonstrates that positive-strand RNA-viruses use alternative conformations of protein-complexes by altered protein-protein interactions for RNA replication and virion morphogenesis. This strategy allows the coordination of the individual processes of the viral life

cycle through the use of a limited set of multifunctional proteins and an efficient regulation of these steps by alternative protein interactions of these viral proteins. Since many viruses use similar mechanisms to regulate their viral life cycle, the present work makes an important contribution to understanding the modular structure and the multifunctionality of viral protein complexes.

2. Einleitung

2.1 Die Virusfamilie *Flaviviridae*

Die Virusfamilie *Flaviviridae* umfasst Viren mit einem einzelsträngigen RNA-Genom (ssRNA), das ca. 9,1-12,5 kb lang ist und eine positive Strangorientierung aufweist. Das RNA-Genom von Vertretern dieser Familie kodiert für einen offenen Leserahmen (engl. *open reading frame*, ORF). Dieser wird in der Zelle in ein Polyprotein (oder Vorläuferprotein) translatiert, welches durch zelluläre und virale Proteasen in die reifen viralen Proteine prozessiert wird. Der virale ORF wird von einer 5'- und 3' nichttranslatierten Region (NTR) flankiert, die essentielle Funktionen im viralen Replikationszyklus erfüllen. Die Viren dieser Virusfamilie haben einen Durchmesser von 40-60 nm, besitzen eine sphärische Form mit einer äußeren Lipidhülle, die von den Membranen der Wirtszelle abstammt (Simmonds et al., 2017). Die Familie *Flaviviridae* wird bisher in vier Genera unterteilt: *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Hepacivirus* und *Pegivirus* (Simmonds et al., 2017). Die Übertragungswege der entsprechenden Viren und die durch ihre Infektion ausgelösten Symptome variieren zwischen den Erregern der *Flaviviridae* teilweise stark (Lindenbach et al., 2013).

Dem Genus *Flavivirus* werden humanpathogene- und tierpathogene Viren zugeordnet, die durch Arthropoden übertragen werden. Aufgrund dieser Art der Übertragung werden Flaviviren oft auch als Arboviren (engl. *arthropod-borne virus*) bezeichnet. Bekannte Vertreter dieses Genus sind beispielsweise das Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME)-Virus, das Dengue-Virus (DENV), das Zika-Virus (ZIKV) und das Gelbfiebervirus, welches namensgebend für dieses Genus und die gesamte Virusfamilie ist (lat. *flavus*, „gelb“).

Dem Genus *Hepacivirus* wurde lange Zeit nur das humanpathogene Hepatitis C-Virus (HCV) zugeordnet. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl neuer Viren entdeckt, die u.a. Nagetiere, Fledermäuse, europäische- und afrikanische Kühe sowie Pferde und Esel infizieren und ebenfalls dem Genus *Hepacivirus* zugeordnet werden könnten (Baechlein et al., 2015; Corman et al., 2015; Drexler et al., 2013; Firth et al., 2014; Kapoor et al., 2011; Kapoor et al., 2013; Quan et al., 2013; Sibley et al., 2014; Walter et al., 2017). Durch diese Vielzahl an Neuordnungen wurde überlegt das Genus *Hepacivirus* in die Spezies *Hepacivirus* A-N zu unterteilen. Aufgrund der besonderen Bedeutung des Hepatitis C-Virus für die Wissenschaft und Medizin, wurde vorgeschlagen das Hepatitis C-Virus in „*Hepacivirus C*“ umzubenennen und es in Zukunft als separate Spezies zu führen (Smith et al., 2016).

Infektionen durch Viren des Genus *Pegivirus* werden vor allem bei Menschen und in nahe verwandten Primatenarten, wie Schimpansen oder Tamarinen, beobachtet. Einer der ersten Vertreter des Genus *Pegivirus* war das GB-Virus-B (GBV-B) (Linnen et al., 1996; Muerhoff et al., 1995; Simons et al., 1995). Ferner werden diesem Genus die GB-Viren GBV-A, GBV-C und GBV-D zugeordnet (Muerhoff et al.,

1995). Für Pegivirusinfektionen konnten bisher keine Zusammenhänge zwischen einer Virusinfektion und der Ausbildung einer Krankheit festgestellt werden (Simmonds et al., 2017). Aufgrund vieler Neuentdeckungen von potentiellen Pegiviren, die neben Primaten auch Pferde, Schweine, Nagetiere und Fledermäuse infizieren, wurde vorgeschlagen, das Genus *Pegivirus* in die Spezies Pegivirus A-K einzuteilen (Adams et al., 1998; Baechlein et al., 2016; Bailey et al., 2016; Chandriani et al., 2013; Kapoor et al., 2013; Quan et al., 2013; Sibley et al., 2014; Smith et al., 2016).

Viren des Genus *Pestivirus* umfassen v.a. Tierseuchenerreger, wie das Virus der bovinen Virusdiarrhö (engl. *bovine viral diarrhoea virus*, BVDV) oder das Virus der klassischen Schweinepest (engl. *classical swine fever virus*, CSFV), die aufgrund ihrer ökologischen- und landwirtschaftlichen Relevanz sowie durch ihre nahe Verwandtschaft zum Hepatitis C-Virus, von hohem Interesse für die Wissenschaft sind. Da sich die vorliegende Arbeit mit Viren des Genus *Pestivirus* auseinandersetzt, wird dieses Genus im folgenden Unterkapitel detailliert betrachtet

2.2 Pestiviren

2.2.1 Taxonomie

In der Vergangenheit wurden Pestiviren zur Virusfamilie *Togaviridae* gezählt (Westaway et al., 1985) und erst später, durch die Etablierung molekularbiologischer Analysemethoden, in die Familie *Flaviviridae* aufgenommen (Heinz et al., 2005).

Derzeit wird das Genus *Pestivirus* in vier Spezies eingeteilt (Simmonds et al., 2017):

- Virus der bovinen Virusdiarrhö Typ 1 (BVDV-1)
- Virus der bovinen Virusdiarrhö Typ 2 (BVDV-2)
- Virus der klassischen Schweinepest (CSFV)
- Border Disease Virus (engl. *border disease virus*, BDV)

Neben diesen Spezies existieren weitere nicht-klassifizierte Pestiviren, wie das Giraffe-Pestivirus (GiPV-H138) (Avalos-Ramirez et al., 2001), das Pronghorn-Antilope-Pestivirus (PAPV) (Vilcek et al., 2005), das Bungowannah-Virus (BuPV) (Kirkland et al., 2007), das atypische Pestivirus von Wiederkäuern (ARPV-Th/04 KhonKaen) (Liu et al., 2009), das Pestivirus aus Schafen (ShPV-Aydin/04-TR) (Becher et al., 2012) sowie das atypische Pestivirus, welches aus Schweinen isoliert wurde (APPV) (Hause et al., 2015). In den letzten Jahren konnten Pestivirussequenzen aus eher untypischen Wirtsspezies isoliert werden, wie z.B. aus Fledermäusen (engl. *bat pestivirus*, BaPV) der Art *Rhinolopus affinis* (Wu et al., 2012). Bislang ist unklar, ob die Fledermäuse wirklich mit einem Pestivirus infiziert sind oder die isolierten Sequenzen aus Insekten stammen, die Teil der Nahrung dieser Fledermäuse sind. Ferner konnte

kürzlich die vollständige kodierende Sequenz eines Pestivirus aus der Rattenart *Rattus norvegicus* isoliert werden (NrPV-NyC/D23) (Firth et al., 2014). Da diese Sequenz aus den Ausscheidungen (Urin) der Ratte sowie dem Serum und Geweben isoliert werden konnte, ist denkbar, dass es in den Rattengewebe aktiv replizieren kann. Diese Eigenschaft wäre im Hinblick auf die Entwicklung eines Kleintiermodells für Pestiviren besonders interessant (Firth et al., 2014).

2.2.2 Grundlegende Eigenschaften von Pestiviren

Pestiviruspartikel wurden erstmals 1971 mittels EM in konzentrierten Virussuspensionen nachgewiesen (Horzinek et al., 1971). Pestiviren sind behüllt und weisen eine sphärische Form mit einem Durchmesser von 40-60 nm auf (Abb. 2.1) (Horzinek et al., 1971; Moennig and Plagemann, 1992). In die Virushülle sind drei virale Glykoproteine E^{rn5}, E1, und E2 eingelagert (Weiland et al., 1990; Weiland et al., 1992). Im Inneren des Viruspartikels befindet sich das virale RNA-Genom, das mit dem Nukleokapsidprotein (engl. *core*, C) komplexiert ist (Thiel et al., 1991). Pestiviren können an eine Virusbildung ohne Kapsidprotein adaptiert werden, da CSFV-Mutanten generiert werden konnten, die die Deletion des Kapsidprotein tolerierten. Für die Kapsid-freie CSFV Virusgenese sind jedoch kompensatorische Mutationen in der NS3 Helikasedomäne essentiell (Riedel et al., 2012; Riedel et al., 2010).

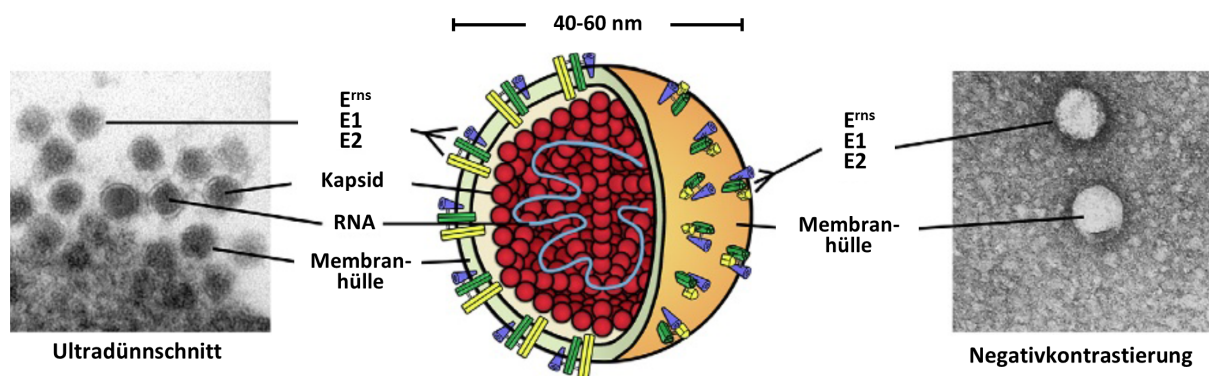


Abb. 2.1: Aufbau von Pestiviren. Pestivirale Virionen haben einen Durchmesser von 40-60 nm und sind mit einer Membranhülle, in der die viralen Glykoproteinen E^{rn5}, E1 und E2 verankert sind, umgeben. Im Inneren des Viruspartikels befindet sich das RNA-Genom, das mit dem Kapsidprotein (C) assoziiert ist. Links: EM-Ultradünnschnitt, Rechts: EM-Negativkontrastierung. Abbildung adaptiert aus Tautz et al., 2015.

Pestivirale Infektionen in Zellkultur können in zwei Biotypen unterschieden werden, der nicht-zytopathogene- (engl. *non-cytopathogenic*, ncp) und der zytopathogene (engl. *cytopathogenic*, cp) Biotyp (Baker, 1987; Tautz et al., 2015). Die Infektion von Zellkulturen mit cp-Viren führt zur Ausbildung eines zytopathischen Effekts (ZPE), der sich durch morphologische Veränderungen (Abrunden und Vakuolisierung, Ablösen aus dem Zellverbund und Zelltod) der infizierten Zellen auszeichnet (Corapi et al., 1988; Hoff and Donis, 1997; Lambot et al., 1998). Ausgelöst wird dieser Phänotyp durch die Induktion der Apoptose (Grummer et al., 2002a; Grummer et al., 2002b; Hoff and Donis, 1997; Schweizer and Peterhans, 1999; Zhang et al., 1996). Im Gegensatz dazu führt die Infektion mit ncp-

Viren zu keinen morphologischen Veränderungen der infizierten Zellen und diese zeigen weiterhin normales Wachstum und Vitalität (Schweizer and Peterhans, 2001).

2.2.3 Infektionen durch Pestiviren

Das Genus *Pestivirus* umfasst ökologisch- und wirtschaftlich relevante Tierseuchenerreger. Zu diesen Erregern zählen u.a. das Virus der bovinen Virusdiarrhö (BVDV, Erreger der bovinen Virusdiarrhö oder *Mucosal Disease* (MD)) sowie das Virus der klassischen Schweinepest (CSFV), das die anzeigepflichtige Tierseuche Klassische Schweinepest hervorruft. Während das Wirtsspektrum von CSFV auf Haus- und Wildschweine beschränkt ist, kann BVDV u.a. Rinder und Schweine sowie Schafe, Ziegen und Wildwiederkäuer infizieren (Becher et al., 1997; Paton et al., 1995; Vilcek and Nettleton, 2006). Die Infektion von adulten- und immunkompetenten Wiederkäuern verläuft i.d.R. ohne oder nur mit milden Symptomen, die nach der Eliminierung des Virus durch den Wirt wieder abklingen. Hochvirulente Pestiviren, wie BVDV-2, können bei horizontaler Übertragung zu schweren Erkrankungen, wie dem hämorrhagischen Syndrom, führen (Rebhun et al., 1989). Die Infektion von Schweinen mit CSFV fällt je nach Virus unterschiedlich aus (Meyers and Thiel, 1996).

Pestiviren sind bei der Infektion trächtiger Tiere in der Lage, die Plazentaschranke des Muttertieres zu überwinden („diaplazentare“ Infektion) und auf diesem Wege das ungeborene Kalb zu infizieren (Moennig and Plagemann, 1992). Die Infektion des ungeborenen Fötus mit nicht-zytopathogenen Viren haben je nach Infektionszeitpunkt während der Trächtigkeit unterschiedliche Folgen für die Schwangerschaft und reichen von Aborten bis zu normalen Geburten. Ist das Virus während der Prägung des Immunsystems anwesend, wird gegenüber dem Virus eine Immuntoleranz ausgebildet. Diese Immuntoleranz ist die Grundlage für die Ausbildung einer persistenten Infektion (engl. *persistently infected*, PI). Da diese Tiere permanent große Virusmengen ausscheiden, stellen sie die Quelle für infektiöse Viren und Hauptursache für stetige Infektionen innerhalb einer Population bzw. Herde dar. Eine persistente Infektion kann nur durch ncp-Viren hervorgerufen werden. In bisherigen Untersuchungen führte eine diaplazentare Infektion mit cp-Viren i.d.R. entweder zur Eliminierung des Virus oder zum Abort des Fötus (Deregt and Loewen, 1995), wobei letzteres auf den zytopathogenen Phänotyp des Virus zurückzuführen ist (Baker, 1987; Corapi et al., 1988; Grummer et al., 2002b; Hoff and Donis, 1997).

Die persistente Infektion kann auch noch nach Jahren ohne Symptome zur Ausbildung der „Mucosal Disease“ (MD) führen, die für das betroffene Tier letal verläuft. Die Erkrankung ist gekennzeichnet durch Läsionen der Schleimhäute, Ulzerationen und Nekrosen des Gastrointestinaltraktes sowie durch blutigen Durchfall, der bei Rindern namensgebend für die Krankheit (engl. *bovine viral diarrhea*, BVD) bzw. das Virus ist (engl. *bovine viral diarrhea virus*, BVDV). Eine Ursache für das Auftreten der „Mucosal Disease“ sind Veränderungen im viralen RNA-Genom durch RNA-Rekombinationsereignisse, die eine

stark gesteigerte Replikation des Virus induzieren und zu einem Wechsel vom nicht-zytopathogenen Biotyp zum zytopathogenen (cp) Biotyp führen (siehe 2.3.6). Da das cp-Virus aus dem ncp-Virus hervorgeht, lassen sich beide Virusformen in dem betroffenen Tier nachweisen (Brownlie and Clarke, 1993).

2.3 Allgemeine Grundlagen zur Replikation von Pestiviren

2.3.1 Der pestivirale Replikationszyklus im Überblick

Für den **Eintritt** in die Wirtszelle benötigen Viren einen spezifischen Rezeptor, i.d.R. ein Protein oder Proteinkomplex auf der Oberfläche der Wirtszelle, an den das Virus spezifisch bindet, um anschließend von der Zelle aufgenommen zu werden (Abb. 2.2 - I). Der Primärrezeptor für BVDV ist das bovine CD46 Protein (engl. *cluster of differentiation 46*, CD46) (Krey et al., 2006), welches auch als MCP (engl. *membrane cofactor protein*, MCP) bekannt ist. Interessanterweise dient CD46 auch anderen humanpathogenen Viren, wie Masern-, Herpes- oder Adenoviren sowie humanpathogenen Bakterien, wie *Streptococcus pyogenes* und *Neisseria*, als Rezeptor (Cattaneo, 2004). Neben CD46 werden für eine erfolgreiche BVDV Infektion weitere Ko-Rezeptoren benötigt, da die alleinige Expression von CD46 in nicht-permissiven (nicht-infizierbaren) Zellen nicht ausreicht, um ein Eindringen von BVDV in die Wirtszelle zu ermöglichen (Maurer et al., 2004). Als mögliche Kandidaten hierfür wurden der LDL-Rezeptor und Glykosaminoglykane beschrieben (Agnello et al., 1999; Flores et al., 1996; Hulst et al., 2000). Es ist denkbar, dass die Bindung von BVDV an die Zielzelle zunächst unspezifisch über die Bindung an Glykosaminoglykanen vermittelt wird (z.B. Heparan-Sulfat), ehe es zur spezifischen Interaktion mit CD46 kommt. Ähnliche Beobachtungen konnten bereits für das Humane Immundefizienzvirus (engl. *human immunodeficiency virus*, HIV) (Patel et al., 1993), das FSME-Virus (Mandl et al., 2001) oder das Zika-Virus (ZIKV) (Kim et al., 2017) gemacht werden. Nach der Rezeptorbindung wird das Virus über die Rezeptor-vermittelte, Clathrin-abhängige Endozytose internalisiert (Flores et al., 1996; Grummer et al., 2004; Lecot et al., 2005). Danach führt die pH-abhängige Ansäuerung des Endosoms zur Verschmelzung von Virus- und Endosomenmembran wodurch der Ribonukleoproteinkomplex, bestehend aus dem viralen RNA-Genom und dem Kapsidprotein, in das Zytoplasma freigesetzt wird (Krey et al., 2005). Essentiell für diesen Schritt sind die viralen Glykoproteine E1 und E2 sowie deren Heterodimerisierung (Ronecker et al., 2008). Über die Freisetzung des viralen RNA-Genoms in das Zytoplasma ist bisher noch wenig bekannt.

Nachdem das virale RNA-Genom in das Zytoplasma der Zelle entlassen wurde, kann es aufgrund seines Aufbaus direkt zur **Translation des viralen Polyproteins** genutzt werden. Anschließend erfolgt die **Prozessierung** des viralen Polyproteins über zelluläre- und virale Proteasen (Abb. 2.2 - II) (siehe 2.3.2). Der Replikationszyklus der *Flaviviridae* findet im Zytoplasma in Assoziation mit Membranen des

endoplasmatischen Retikulums (ER) statt (Lindenbach et al., 2013; Tautz et al., 2015). Charakteristisch für den viralen Lebenszyklus vieler Vertreter der *Flaviviridae* ist eine spezifische Umformung von ER-Membranen zur Ausbildung von lokal abgeschirmten Bereichen, in denen die virale **RNA-Replikation** stattfinden kann (Abb. 2.2 - III) (Egger et al., 2002; Gillespie et al., 2010; Gosert et al., 2003; Moradpour et al., 2004; Romero-Brey and Bartenschlager, 2014; Welsch et al., 2009). Durch dieses „membranous web“ wird eine hohe lokale Konzentration von viralen Proteinen sowie der Schutz vor Komponenten der zellulären Immunantwort erreicht. Für Pestiviren konnte die Existenz dieser Strukturen noch nicht eindeutig belegt werden (Schmeiser et al., 2014; Weiskircher et al., 2009).

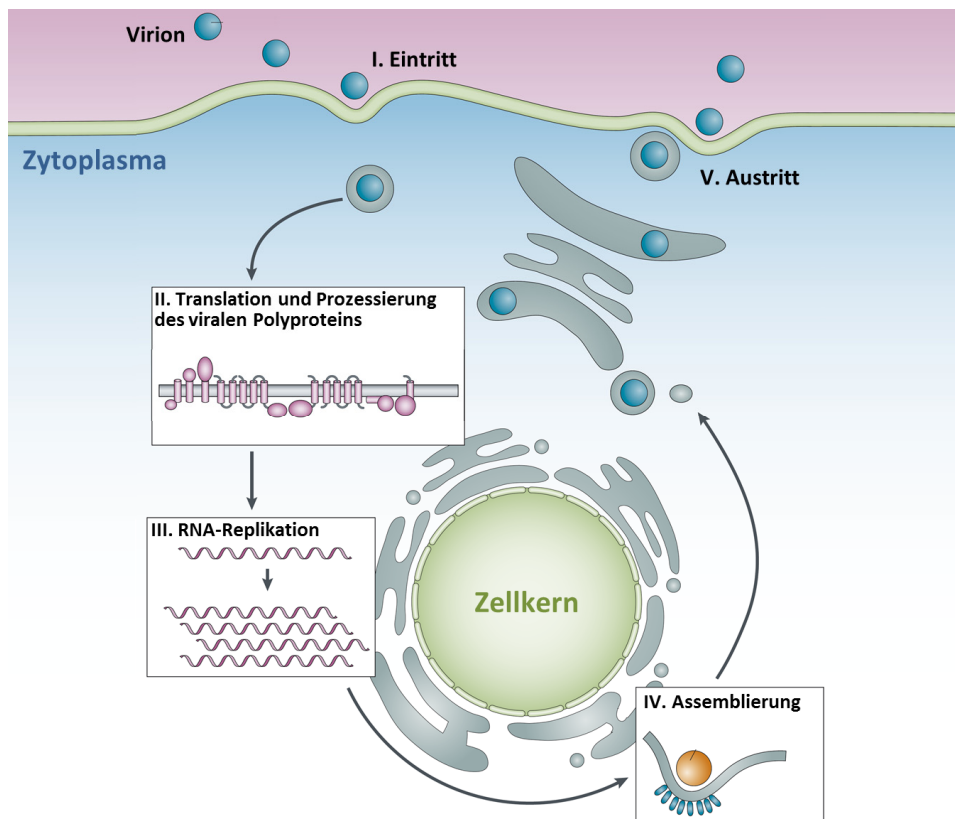


Abb. 2.2: Schematische Darstellung des pestiviralen Lebenszyklus. Die Infektion der Wirtszelle erfolgt über die Bindung des Virus an den Rezeptor CD46 und die Rezeptor-vermittelte Endozytose (I.). Nach der Freisetzung wird das virale RNA-Genom zur Translation des viralen Polyproteins genutzt, welches ko- und posttranslational von zellulären- und viralen Proteasen prozessiert wird (II.). Nachdem die virale Replikase assembliert ist, erfolgt die RNA-Replikation des viralen Genoms an den Membranen des endoplasmatischen Retikulums (III.). In der späten Phase der Infektion kommt es zum Zusammenbau der Virionen (IV.) und zum Zellaustritt der Viruspartikel über den sekretorischen Transportweg (V.). Abbildung adaptiert aus Murray *et al.*, 2008.

In der späten Phase der Infektion kommt es an den ER-Membranen zur **Assemblierung** der infektiösen Viruspartikel (Abb. 2.2 - IV). Es wird angenommen, dass die RNA-Replikation und die Virionmorphogenese eng gekoppelte Prozesse sind (Lindenbach, 2013; Pietschmann et al., 2009). Der **Austritt** des Viruspartikels erfolgt über den klassischen sekretorischen Transportweg der Zelle unter

der Beteiligung des Golgi-Apparates (Abb. 2.2 - V) (Grummer et al., 2001; Macovei et al., 2006; Ohmann, 1990; Schmeiser et al., 2014). Da die pestivirale Virionmorphogenese zentrales Thema dieser Arbeit ist, wird sie ausführlich in Kapitel 2.4 beschrieben.

2.3.2 RNA-Genom und Polyproteinprozessierung

Das pestivirale **RNA-Genom** ist ein einzelsträngiges positiv-orientiertes RNA-Molekül, welches eine Größe von ca. 12,3 kb aufweist (Abb. 2.3 - oben). Durch natürlich auftretende RNA-Rekombinationsereignisse in der Zelle kann die Größe des Genoms bis zu 16,5 kb betragen (Becher et al., 1999; Meyers et al., 1992). Es wurde gezeigt, dass RNA-Genome bis zu 20 kb in infektiöse Virionen verpackt werden können (Gallei et al., 2004). Das pestivirale RNA-Genom kodiert in einem offenen Leserahmen (engl. *open reading frame*, ORF) ein Polyprotein, das aus ca. 3900 Aminosäuren besteht (Becher et al., 1998; Collett et al., 1988a; Meyers et al., 1989a) (Abb. 2.3 - mittig). Der virale ORF wird von einer 5'- und einer 3'NTR flankiert, die sog. *cis*-aktive Elemente enthalten, die für den viralen Lebenszyklus regulatorische Funktionen besitzen (Frolov et al., 1998). Die Länge der 5'NTR ist ca. 400 Nukleotide (nt) und die der 3'NTR ca. 200 nt. Im Gegensatz zu zellulären mRNAs besitzt das RNA-Genom von Pestiviren weder eine 5'-Cap-Struktur, noch ist es am 3'-Ende polyadenyliert (Brock et al., 1992; Collett et al., 1988a; Deng and Brock, 1992; Meyers et al., 1989a; Moormann et al., 1990).

Die 5'NTR ist als interne Ribosomeneintrittsstelle (IRES) essentiell für die Translationsinitiation und ermöglicht die direkte Positionierung zellulärer Ribosomen an das Translationsstart-Kodon (AUG) (Chon et al., 1998; Fletcher and Jackson, 2002; Frolov et al., 1998; Myers et al., 2001; Poole et al., 1995; Rijnbrand et al., 1997). Die 5'NTR bildet vier RNA Sekundärstrukturen (engl. *stem loop*, SL), SLIa, SLIb, SLII und SLIII aus, die die Translationsinitiation vermitteln sowie wichtige Funktionen für die virale RNA-Replikation besitzen. Als besonders kritisch für beide Funktionen stellte sich der SL Ia heraus (Grassmann et al., 2005; Yu et al., 2000).

Die 3'NTR wird in eine „3'-variable“ (3'V)-Region sowie eine konservierte „3'conserved“ (3'C)-Region unterteilt und bildet die RNA Strukturen SL III (oder SL_{Stop}), SL II und SL I aus. In der 3'V-Region, die SL III und SL II umfasst, befinden sich mehrere „*in-frame*“-Stopkodons, die eine vollständige Translationstermination sicherstellen, da das authentische Stopkodon zu keiner vollständigen Termination führt (Isken et al., 2004). Die 3'C-Region umfasst die letzten ca. 100 Nukleotide des viralen RNA-Genoms (Becher et al., 1998) und ist für die Initiation der Negativstrang-Synthese während der RNA-Replikation essentiell (Pankraz et al., 2005; Yu et al., 1999). Man vermutet, dass die Bildung des viralen Replikationskomplexes im Anschluss an die Polyproteinprozessierung *in cis* am 3' Ende des RNA-Genoms geschieht, da die funktionelle *trans*-Komplementation von Proteinen der viralen Replikase bisher nur für NS5A gezeigt werden konnte (Grassmann et al., 2001). Für die BVDV 3'NTR

konnte außerdem die Bindung von Wirtsproteinen der Gruppe NF90/NFAR nahegelegt werden, die für die Assemblierung der viralen Replikase wichtig sind (Isken et al., 2003).

Das im pestiviralen Genom kodierte **Polyprotein** besteht aus ca. 3900 Aminosäuren (AS) und wird ko- und posttranslational in 12 Proteine N^{pro} , Kapsidprotein (C), E^{rns} , E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B prozessiert (Abb. 2.3 - unten) (Becher et al., 1998; Collett et al., 1988a; Lamp et al., 2011; Lindenbach et al., 2013; Meyers et al., 1989a; Tautz et al., 2015). Dabei unterscheidet man grundsätzlich zwischen den Struktur- und den Nichtstrukturproteinen (NS-Proteine). Die Strukturproteine sind Bestandteil infektiöser Virionen, wohingegen die Nichtstrukturproteine zwar an allen Prozessen des viralen Lebenszyklus beteiligt sind, sich jedoch nicht im freigesetzten Viruspartikel nachweisen lassen. Eine Besonderheit bei Pestiviren sind die Autoprotease N^{pro} am N-Terminus des Polyproteins und das E^{rns} Protein (Lindenbach et al., 2013; Stark et al., 1993).

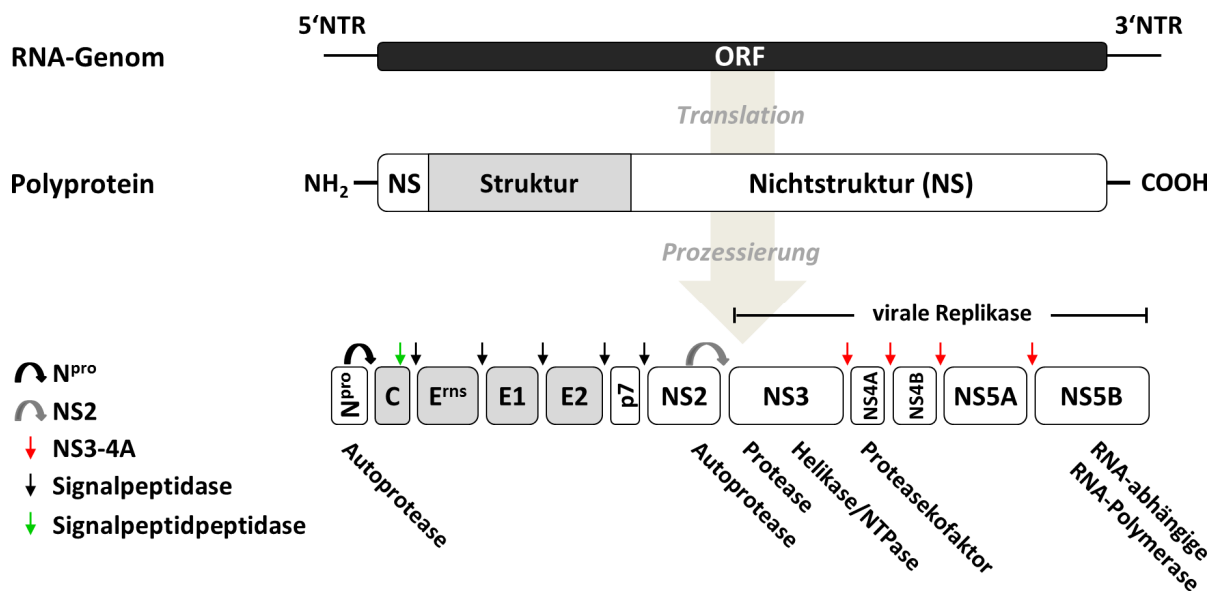


Abb. 2.3: Das pestivirale Polyprotein und die Polyproteinprozessierung. Das pestivirale RNA-Genom hat eine positive Strangorientierung und wird von nichttranslatierten Regionen (NTR) flankiert. Es kodiert in einem offenen Leserahmen (ORF) für ein Polyprotein, das ko- und posttranslational durch die viralen Proteasen N^{pro} , NS2 und NS3-4A sowie durch die zelluläre Signalpeptidase und Signalpeptidpeptidase prozessiert wird. Die Strukturproteine (C, E^{rns} , E1, E2) (grau) und Nichtstrukturproteine (N^{pro} , p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) (weiß) sind gekennzeichnet. Die entsprechenden Protease-Spaltstellen (\downarrow bzw. \curvearrowright , siehe Legende links) und die Funktionen der jeweiligen Proteine sind angegeben. Die Komponenten der minimalen viralen Replikase (NS3-5B) sind gekennzeichnet.

Die **Prozessierung des viralen Polyproteins** erfolgt durch zelluläre- und virale Proteasen (Tautz et al., 2015). Die N-terminale virale Autoprotease N^{pro} spaltet sich autoproteolytisch vom Polyprotein ab und generiert damit den eigenen C-Terminus und den N-Terminus des Kapsidproteins (C) (Stark et al., 1993; Wiskerchen et al., 1991). Die Spaltungen zwischen den Proteinen C/ E^{rns} , E^{rns} /E1, E1/E2, E2/p7 und

p7/NS2 werden durch die zelluläre Signalpeptidase katalysiert, die im Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert ist (Bintintan and Meyers, 2010; Elbers et al., 1996; Harada et al., 2000; Rügenapf et al., 1993). Darüber hinaus wird das Kapsidprotein (C) C-terminal durch die Signalpeptidase prozessiert (Heimann et al., 2006). Die Prozessierung zwischen NS2 und NS3 erfolgt über die NS2-Autoprotease (Lackner et al., 2004). Die Spaltungen zwischen NS3/4A, NS4A/4B, NS4B/5A sowie NS5A/5B werden von dem multifunktionellen NS3-Protein durchgeführt, wobei die Prozessierung von NS4A/4B, NS4B/5A und NS5A/5B von der Einlagerung des NS3-Proteasekofaktors NS4A abhängt (Lamp et al., 2011; Lamp et al., 2013; Tautz et al., 1997; Tautz et al., 2000; Wiskerchen and Collett, 1991; Xu et al., 1997).

2.3.3 Virale Strukturproteine

Die pestiviralen Strukturproteine umfassen das Kapsidprotein, E^{rns}, E1 und E2 (Abb. 2.1 und 2.3). Das Kapsidprotein ist im Inneren des Viruspartikels mit dem viralen RNA-Genom assoziiert, wohingegen E^{rns}, E1 und E2 die viralen Glykoproteine der Hüllmembran (engl. *envelope*, E) darstellen und in dieser verankert sind (Thiel et al., 1991).

Das **Kapsidprotein** oder **Core (C)** ist ca. 14 kDa groß und aufgrund seiner positiven Ladung in der Lage, das virale RNA-Genom zu binden. C liegt intrinsisch ungeordnet vor und bindet RNA sequenzunspezifisch mit geringer Affinität (Ivanyi-Nagy et al., 2008; Murray et al., 2008b). Ferner lässt sich das Kapsidprotein *in trans* komplementieren, was auf eine gewisse funktionelle Dynamik schließen lässt. Interessant in diesem Kontext ist, dass CSFV-Derivate generiert werden konnten, in denen unterschiedlich große Bereiche des Proteins entfernt wurden, ohne Einfluss auf die Virionmorphogenese (Riedel et al., 2010). Darüber hinaus ist es möglich CSFV durch kompensatorische Mutationen in der NS3 Helikasedomäne an eine Core-unabhängige Virionmorphogenese zu adaptieren (Riedel et al., 2012; Riedel et al., 2010). Neueste Studien zur Core-unabhängigen Virionmorphogenese belegen, dass infizierende Kapsidprotein-freie Viren anfälliger für die Interferon (engl. *interferon*, IFN)-induzierte Immunantwort sind, was zur Attenuierung dieser Viren im natürlichen Wirt führt (Riedel et al., 2017).

Das Glykoprotein E^{rns} ist einzigartig für das Genus *Pestivirus* (Lindenbach et al., 2013; Rügenapf et al., 1993; Simmonds et al., 2017). Es ist Bestandteil des Viruspartikels, besitzt aber auch durch seine intrinsische RNase-Aktivität eine antagonistische Wirkung gegen die IFN-induzierte Immunantwort (Iqbal et al., 2004; Magkouras et al., 2008; Matzener et al., 2009). E^{rns} ist stark glykosyliert und liegt in seiner reifen Form als Homodimer mit intra- und intermolekularen Disulfidbrücken vor, (Hulst and Moormann, 2001; Thiel et al., 1991). E^{rns} ist durch eine C-terminale amphipathische α -Helix mit der Virusmembran assoziiert (Aberle et al., 2014; Fetzer et al., 2005; Tews and Meyers, 2007). Daneben dient diese α -Helix als Retentionssignal, wodurch rund 95% des an die Zelloberfläche sekretierten E^{rns}

in die Zelle zurückgeführt werden (Burrack et al., 2012). Die Bezeichnung E^{rns} (engl. *ribonuclease secreted*, *rns*) kennzeichnet die RNase-Aktivität, die E^{rns} in seiner Membran-assoziierten Form als auch in seiner sekretierten Form aufweist (Schneider et al., 1993; Windisch et al., 1996). Dabei handelt es sich um eine T2 Ribonukleaseaktivität (Hulst et al., 1994; Krey et al., 2012; Schneider et al., 1993), deren RNase-Funktion kritisch für die Unterdrückung der antiviralen Interferonantwort ist, die durch extrazelluläre dsRNA oder ssRNA induziert wird (Iqbal et al., 2004; Magkouras et al., 2008; Matzener et al., 2009). Es konnte gezeigt werden, dass diese Funktion ein wichtiger Virulenzfaktor ist, da CSFV-Derivate mit inaktiver RNase-Aktivität im natürlichen Wirt attenuiert sind (Meyer et al., 2002; Meyers et al., 1999). Folglich ist E^{rns} wichtig für die Etablierung einer persistenten Infektion.

Das Glykoprotein **E1** ist verhältnismäßig wenig untersucht. Während der Freisetzung von E1 kommt es zur Ausbildung eines E^{rns} -E1 Proteinvorläufers mit bisher unbekannter Funktion (Rümenapf et al., 1993). Das 25-33 kDa große E1 Protein ist Teil des Virions und in der Virushülle verankert (Thiel et al., 1991; Weiland et al., 1990). Zudem ist E1 durch seine konservierten Cysteine in der Lage, Heterodimere mit E2 auszubilden (Rümenapf et al., 1993; Weiland et al., 1990).

Das Glykoprotein **E2** ist 53-55 kDa groß wird durch die Signalpeptidase aus dem viralen Polyprotein entlassen. In der Zelle ist ein E2-p7-Vorläufer nachweisbar, der für die Ausbildung infektiöser Virionen nicht essentiell ist (Harada et al., 2000; Rümenapf et al., 1993). E2 vermittelt die Bindung des Virus an den pestiviralen Rezeptor CD46 (Krey et al., 2006; Maurer et al., 2004). Nach der Rezeptor-vermittelten Endozytose erfolgt im Endosom die Fusion der Virusmembran mit der Endosomenmembran, wofür die Ausbildung eines E1/E2-Heterodimers wahrscheinlich essentiell ist (Wang et al., 2004). Strukturbestimmungen der CSFV E2 Ektodomäne weisen auf eine bislang unbekannt Form eines Fusionsproteins hin (El Omari et al., 2013; Li et al., 2013) und es wird vermutet, dass Pestiviren (und eventuell auch HCV) eine untypische Form der Membranfusion unterstützen.

2.3.4 Virale Nichtstrukturproteine

Anders als die viralen Strukturproteine, lassen sich die Nichtstrukturproteine nicht im infektiösen Virion nachweisen (Thiel et al., 1991). Dennoch sind sie funktionell an den Prozessen des viralen Lebenszyklus beteiligt. Bis auf das Nichtstrukturprotein N^{pro} weisen alle Proteine eine Membranverankerung oder eine Membranassoziation mit dem ER-Membransystem auf. Bei Pestiviren, sowie beim nahe verwandten HCV, bilden die Proteine NS3-5B zusammen mit bislang nicht näher charakterisierten zellulären Proteinen die sog. „minimale Replikase“ aus und sind somit essentiell für die virale RNA-Replikation (Behrens et al., 1998; Lohmann et al., 1999) (Abb. 2.3). Eine Besonderheit der *Flaviviridae* ist, dass auch die Nichtstrukturproteine an der Bildung infektiöser Virionen beteiligt sind (Murray et al., 2008a).

Die virale N-terminale Autoprotease **N^{pro}** ist einzigartig für den Genus *Pestivirus* (Lindenbach et al., 2013; Simmonds et al., 2017). **N^{pro}** ist eine Cysteinprotease, die sich autoproteolytisch vom Polyprotein abspaltet und somit ihren eigenen C-Terminus und den N-Terminus des Kapsidproteins generiert (Stark et al., 1993; Wiskerchen et al., 1991). Da der C-terminus des Proteins danach im aktiven Zentrum verbleibt, wird **N^{pro}** durch die Abspaltung inaktiviert (Gottipati et al., 2013). **N^{pro}** wird heute einer eigenen Klasse, den C53-Proteasen zugewiesen (Gottipati et al., 2013; Rawlings et al., 2012; Zögg et al., 2013). Eine weitere wichtige Funktion von **N^{pro}** ist die Hemmung der IRF-3 (engl. *interferon regulatory factor 3*, IRF-3) -induzierten Immunantwort, indem es die Degradation von IRF-3 im Proteasomen induziert und damit die Etablierung einer persistenten Infektion bei BVDV und CSFV ermöglicht (Bauhofer et al., 2007; La Rocca et al., 2005; Ruggli et al., 2003; Seago et al., 2007).

Das virale **p7** ist ca. 7 kDa groß und für die Bildung infektiöser Pestiviruspartikel essentiell (Gladue et al., 2012; Harada et al., 2000; Sakai et al., 2003), eine Funktion, die auch für HCV-p7 nachgewiesen wurde (Lin et al., 1994; Steinmann et al., 2007). Zudem ist CSFV-p7 ein wichtiger Virulenzfaktor im natürlichen Wirt (Gladue et al., 2012). Das p7 von CSFV und HCV weist strukturelle Gemeinsamkeiten mit Viroporinen auf (Harada et al., 2000; Largo et al., 2014). Das sind kleine integrale Membranproteine, die durch Oligomerisierung Membranen destabilisieren und dadurch Ionenkanäle ausbilden (Carrasco, 1995; Gonzalez and Carrasco, 2003). Es konnte experimentell belegt werden, dass HCV-p7 (Griffin et al., 2004; Madan and Bartenschlager, 2015) und pestivirales p7 Viroporine sind (Largo et al., 2014; Luscombe et al., 2010). Ferner ist p7 über Protein-Protein-Interaktionen an der Assemblierung von infektiösen Virionen beteiligt (Wozniak et al., 2010). Wichtige virale Interaktionspartner für HCV-p7 scheinen Core, NS2 und NS5A zu sein (Gouklani et al., 2013).

Auf das p7 folgen im Polyprotein **NS2-3 (bzw. NS2 und NS3)** und **NS4A**. Da diese Proteine von besonderer Bedeutung für den pestiviralen Lebenszyklus sind und eine zentrale Stellung in dieser Arbeit haben, werden sie detailliert in Kapitel 2.3.5 behandelt.

Das pestivirale **NS4B** ist ein hydrophobes Transmembranprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 35 kDa, das an intrazellulären Membranen des Golgi-Apparates und von Mitochondrien lokalisiert (Weiskircher et al., 2009). Für NS4B von CSFV konnte NTPase-Aktivität nachgewiesen werden (Einav et al., 2004; Gladue et al., 2011). NS4B ist Bestandteil der minimalen Replikase und essentiell für die virale RNA-Replikation (Behrens et al., 1998; Collett et al., 1991; Grassmann et al., 2001). Für HCV konnte gezeigt werden, dass NS4B sich mit bis zu vier Transmembrandomänen in Membranen einlagert und an der Bildung des „membranous web“ beteiligt ist (Gosert et al., 2003; Moradpour et al., 2004; Moradpour et al., 2003). C-terminale NS4B Protein-Protein-Interaktionen mit weiteren NS4B-Molekülen sind essentiell für die RNA-Replikation (Paul et al., 2011) und kritisch für die korrekte Lokalisation von NS5A ist (Biswas et al., 2016).

Das **NS5A** von Pestiviren, als auch das NS5A von HCV, ist ein ca. 58 kDa großes Zink-koordinierendes Phosphoprotein, welches in der Lage ist, die virale RNA zu binden (Reed et al., 1998; Sheng et al., 2012; Tellinghuisen et al., 2004; Tellinghuisen et al., 2006). Im Gegensatz zu Pestiviren lässt sich für HCV eine basal- oder hypo- (56 kDa) und eine hyperphosphorylierte Form (58 kDa) unterscheiden (Kaneko et al., 1994). NS5A ist ein essentieller Bestandteil der viralen Replikase und lässt sich als einziges Protein dieses Komplexes *in trans* komplementieren (Behrens et al., 1998; Grassmann et al., 2001). NS5A ist aus drei Domänen aufgebaut (DI, DII, DIII) (Isken et al., 2014; Tellinghuisen et al., 2004). Am N-Terminus weist HCV-NS5A eine amphipathische α -Helix auf, die für die Assoziation von NS5A an der ER-Membran verantwortlich ist (Brass et al., 2002; Brass et al., 2007; Elazar et al., 2003). Ferner lokalisiert NS5A an Lipid Droplets (LD) (Isken et al., 2014; Shavinskaya et al., 2007). Die molekularen Details zur Funktion von NS5A während der viralen RNA-Replikation sind bislang nicht umfassend verstanden. Es wird vermutet, dass CSFV-NS5A die Bindung an die virale 3'NTR und durch direkte Proteininteraktion mit NS5B die RNA-Replikation reguliert (Chen et al., 2012; Sheng et al., 2012; Xiao et al., 2009). Für HCV NS5A wurden zahlreiche Interaktionen mit zellulären Interaktionspartnern identifiziert und es wird NS5A die Funktion eines Chaperonmoleküls zugeschrieben, das durch unterschiedliche Proteininteraktionen mit zellulären und viralen Proteinen verschiedene Prozesse im viralen Lebenszyklus ermöglicht (Ross-Thriepland and Harris, 2015). Ferner wurde HCV-NS5A eine essentielle und koordinierende Rolle während der Virusassemblierung zugeordnet (Appel et al., 2008). Es zeigte sich, dass DIII kritisch für die Interaktion von NS5A mit der viralen RNA und mit dem Kapsidprotein ist und dadurch aktiv zum Übergang von Genomsynthese zur Virionmorphogenese beiträgt (Masaki et al., 2008; Zayas et al., 2016).

Das ca. 77 kDa große virale **NS5B** ist die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase (eng. *RNA-dependent RNA Polymerase*, RdRp), welche die *de novo* Synthese neuer RNA-Genome katalysiert (Kao et al., 1999; Lai et al., 1999; Steffens et al., 1999; Zhong et al., 1998). Für diese Aktivität ist die Assemblierung der Proteine NS3-5B (virale Replikase) (Behrens et al., 1998) sowie die Bindung von Kationen wie Mg^{2+} oder Mn^{2+} durch das konservierte Aminosäuremotiv GDD essentiell (Wang et al., 2007). Die Mutation dieses Motivs zu GAA führt zur Inaktivierung der RNA-Polymerase. Dem NS5B C-Terminus wurde außerdem eine essentielle Rolle während der pestiviralen Virionmorphogenese zugeordnet (Ansari et al., 2004).

2.3.5 Die pestiviralen Proteine NS2, NS3 und NS4A und ihre Proteinkomplexe

Die Proteine NS2, NS3 und NS4A bilden zusammen verschiedene Proteinkomplexe, die durch die Anlagerung weiterer Komponenten spezifische Funktionen im viralen Lebenszyklus ausüben. Diese Komplexe haben zentrale Funktionen in der RNA-Replikation und der Virionmorphogenese (Lackner et al., 2004; Dubrau et al., 2017). NS2, NS3 und NS4A entstehen durch die Signalpeptidase-vermittelte Spaltung zwischen p7 und NS2 (Elbers et al., 1996), die NS2-3-Spaltung, welche von der NS2-Protease katalysiert wird (Lackner et al., 2004) sowie durch die *cis*-Spaltung zwischen NS3 und NS4A, durchgeführt von der NS3-Serinprotease (Tautz et al., 2000; Xu et al., 1997). Bezogen auf den NS2-3-4A-Bereich wird zunächst der Proteinvorläufer **NS2-3** aus dem Polyprotein freigesetzt, worauf sich die Spaltung zwischen NS2 und NS3 anschließt. Während man früher davon ausging, dass ungespaltenes NS2-3 in der RNA-Replikation von Pestiviren genutzt werden kann (Collett et al., 1988b; Meyers et al., 1991; Meyers et al., 1992), belegen aktuelle Studien die essentielle Rolle der NS2-3-Spaltung und die damit einhergehende Freisetzung von NS3 für die virale RNA-Replikation (Lackner et al., 2004). Bei verschiedenen Pestiviren ist die Prozessierung von NS2-3 unterschiedlich effizient, jedoch nie vollständig (Meyers and Thiel, 1996). Ferner wurde dem Proteinvorläufer NS2-3 eine essentielle Funktion in der pestiviralen Virionmorphogenese zugeschrieben (Agapov et al., 2004; Moulin et al., 2007). Da weder ungespaltenes NS2-3 in der RNA-Replikation, noch freies NS3 in der Virionmorphogenese genutzt werden kann, sind Pestiviren für den vollständigen Lebenszyklus auf beide Proteinformen angewiesen. Dadurch stellt die Prozessierung von NS2-3 einen molekularen Mechanismus für das Umschalten von der RNA-Replikation (frühe Phase der Infektion) zur Virusassemblierung (späte Phase der Infektion) dar (Abb. 2.4). Die Regulation der RNA-Replikation durch die NS2-3-Spaltung ermöglicht ferner die Etablierung einer persistenten Infektion (Lackner et al., 2005; Lackner et al., 2004). Somit ist die Regulation der NS2-3-Spaltung von kritischer Bedeutung.

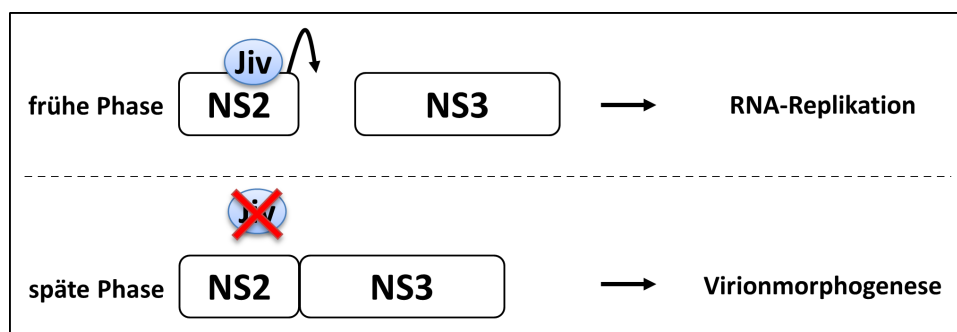


Abb. 2.4: Die zeitliche Regulation der NS2-3-Spaltung dient im pestiviralen Lebenszyklus dem Umschalten zwischen RNA-Replikation und Virionmorphogenese. Die Aktivität der NS2-Protease hängt von der Bindung des zellulären Kofaktors Jiv (engl. *J-domain protein interacting with viral protein*, Jiv) (blau) an NS2 ab. In der frühen Phase der Infektion ist dieser im Überschuss vorhanden, wodurch es zur Aktivierung der NS2-Protease und zur NS2-3-Spaltung kommt (oben). Das freigesetzte NS3 assembliert mit den anderen NS-Proteinen zur viralen Replikase (NS3-5B) und vermittelt die RNA-Replikation. In der späten Phase der Infektion ist das verfügbare Jiv

der Zelle stark verringert, wodurch die NS2-Protease sehr ineffizient aktiviert wird. In der Folge liegt vornehmlich primär ungespaltenes NS2-3 in der Zelle vor, das essentiell für die pestivirale Virionmorphogenese benötigt wird (unten).

Die Spaltung von NS2-3 erfolgt durch die Autoproteaseaktivität des **NS2**-Proteins. Das pestivirale NS2 besitzt ein Molekulargewicht von ca. 45 kDa und ist durch die N-terminale Transmembrandomäne (TM) in der ER-Membran verankert. Bioinformatischen Analysen zufolge ist die N-terminale Hälfte des NS2-Proteins mit ca. 7-8 Transmembransegmenten integral in zelluläre Membranen eingelagert. Im C-terminalen NS2 Anteil ist die NS2 Proteasedomäne, die Cysteinprotease-Aktivität aufweist, lokalisiert (Abb. 2.5 - oben) (Lackner et al., 2004). Für seine Aktivität ist die NS2-Protease auf die Interaktion mit dem zellulären Kofaktor Jiv (engl. *J-domain protein interacting with viral protein*, Jiv) angewiesen, ein zelluläres Chaperon, das auch als DNAJC-14 bekannt ist (Lackner et al., 2005; Rinck et al., 2001). Die NS2-Aktivierung erfolgt durch die Interaktion von NS2 mit dem Kofaktor Jiv über zwei Jiv-bindende Motive in der NS2 Proteasedomäne (Abb. 2.5 – oben – I und II), wodurch die NS2-3-Spaltung *in cis* und dadurch die NS3 Freisetzung ermöglicht wird. Der genaue Mechanismus der NS2-Aktivierung ist bislang noch nicht in allen molekularen Details aufgeklärt, u.a. da strukturelle Informationen über den NS2-Jiv Komplex nicht zur Verfügung stehen. Die funktionelle Charakterisierung zeigte, dass ein minimales Jiv-Fragment von 90 AS (Jiv90) und die strukturelle Integrität des Zink-koordinierenden Motives im NS2 Voraussetzungen für die NS2-Aktivierung sind (Lackner et al., 2006; Rinck et al., 2001). Durch seine Funktion in der NS2-Aktivierung und die damit verbundene NS3 Freisetzung besitzt Jiv eine zentrale Rolle für die Ausbildung eines funktionellen Replikationskomplexes und damit für die RNA-Replikation. Durch diese funktionelle Bedeutung ist Jiv ein wichtiger proviraler Wirtsfaktor der Zelle und reguliert den Wechsel zwischen RNA-Replikation und Virionmorphogenese (Abb. 2.4). Die Jiv-Überexpression führt in ncp-infizierten Zellen aufgrund der gesteigerten Freisetzung von NS3 und der daraus resultierenden gesteigerten RNA-Replikation zur Ausbildung eines cp-Biotyps (Rinck et al., 2001). Die Aktivierung der NS2-Protease erfolgt bereits durch stöchiometrische Mengen von Jiv (Lackner et al., 2005). Ferner weist Pestivirus NS2 ein Zink-koordinierendes Motiv auf. Das NS2-Protein von HCV ist im Vergleich zum pestiviralen NS2 deutlich kürzer, weist aber ebenfalls eine N-terminale Transmembrandomäne und eine C-terminale Proteasedomäne mit Cysteinprotease-Aktivität auf (Abb. 2.5 – unten). Im Gegensatz zu Pestiviren, wird die NS2-Protease von HCV *in cis* durch die NS3 Proteasedomäne aktiviert, wodurch die Spaltung von NS2-NS3 in Zellkultur hocheffizient ist (Grakoui et al., 1993; Hijikata et al., 1993; Isken et al., 2015; Schregel et al., 2009).

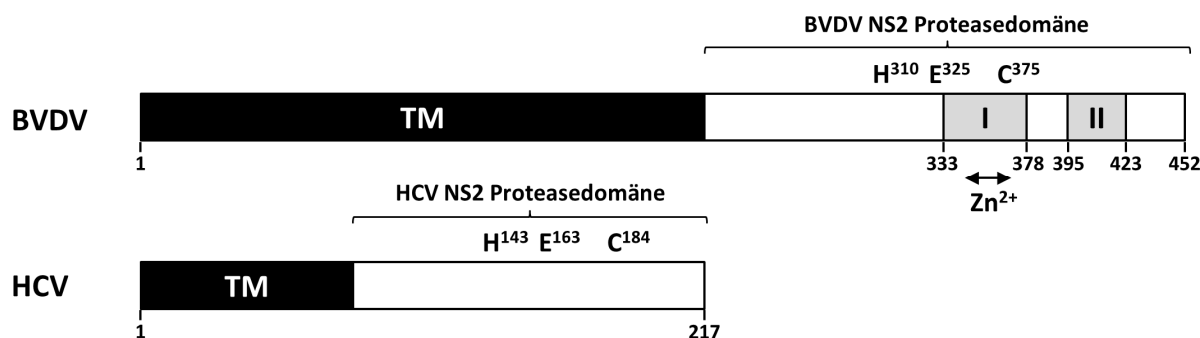


Abb. 2.5: Vergleich der NS2-Proteine von Pestiviren und HCV. Schematische Darstellung von BVDV-NS2 und HCV-NS2. Das pestivirale NS2 ist mit 452 AS nahezu doppelt so lang wie HCV-NS2. Beide NS2-Proteine lassen sich in eine N-terminale Transmembrandomäne (TM) und eine C-terminale Proteasedomäne mit Cysteinprotease-Aktivität einteilen. Im Gegensatz zu HCV besitzt BVDV NS2 zwei Jiv Protein-bindende Motive (Boxen I und II) und ein Zink-koordinierendes Motiv (Zn^{2+}). Die Aminosäuren des jeweiligen katalytischen Zentrums sind gekennzeichnet.

Das pestivirale **NS3** ist ein multifunktionelles Protein mit einem Molekulargewicht von 75-80 kDa (Wiskerchen and Collett, 1991). Innerhalb des Genus *Pestivirus* ist NS3 hochkonserviert (Becher et al., 1994; Meyers and Thiel, 1996) und ist strukturell und funktionell in zwei Domänen organisiert. N-terminal befindet sich die NS3 Proteasedomäne, die Serinprotease-Aktivität aufweist, die durch eine kurze flexible Aminosäuresequenz mit der C-terminale gelegenen NS3 Helikasedomäne verbunden ist, die Helikase- und NTPase-Aktivität besitzt (Abb. 2.6 A) (Bazan and Fletterick, 1989; Gorbalenya et al., 1989a; Gorbalenya et al., 1989b; Warrenner and Collett, 1995; Wiskerchen et al., 1991). Für seine vollständige proteolytische Funktionalität ist NS3 auf die Einlagerung seines Kofaktors NS4A angewiesen, der sich in den N-terminalen Bereich der NS3 Proteasedomäne einlagert (Tautz et al., 2000; Xu et al., 1997). Die NS3-4A Protease vermittelt die Freisetzung von NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B. Während die Spaltung zwischen NS3 und NS4A ausschließlich *in cis* erfolgt, können die anderen Spaltstellen *in trans* bedient werden. Die Prozessierungen zwischen NS4B/5A und NS5A/5B hängen essentiell von NS4A ab (Bazan and Fletterick, 1989; Gorbalenya et al., 1989a; Gorbalenya et al., 1989b; Tautz et al., 2000; Warrenner and Collett, 1995; Wiskerchen et al., 1991; Xu et al., 1997). Erst kürzlich konnte eine weitere Spaltstelle für NS3-4A identifiziert werden, die zur Separierung der NS3-Protease (NS3p; AS 1-190; 26 kDa) und Helikasedomäne führen (Lamp et al., 2013). NS3 ist Bestandteil der viralen Replikase (NS3-5B) und essentiell für die virale RNA-Replikation (Behrens et al., 1998; Tamura et al., 1993; Warrenner and Collett, 1995). Die NS3 Helikasedomäne besitzt Helikase- und NTPase-Aktivität, die während der viralen RNA-Replikation für die Entwindung des viralen RNA-Genoms benötigt werden. Interessanterweise zeigte sich weiterhin, dass die CSFV NS3 Helikasedomäne eine kritische Bedeutung in der pestiviralen Core-unabhängigen Virionmorphogenese hat (Riedel et al., 2017; Riedel et al., 2012; Riedel et al., 2010). Diese Beobachtung unterstreicht die Multifunktionalität von NS3 und seine zentrale Rolle im pestiviralen Lebenszyklus.

NS4A ist 64 Aminosäuren lang und der essentielle Kofaktor der NS3-Protease. NS4A besteht aus einer Transmembrandomäne (AS 1-20) und einem C-terminalen Anteil (AS 21-64) (Abb. 2.6 B). Der C-terminale Teil lagert sich *in cis* mit der NS3 Proteasedomäne zusammen, wodurch der **NS3/4A-Komplex** gebildet wird, der essentiell für die virale Polyproteinprozessierung und die RNA-Replikation ist (Abb. 2.6 C) (Behrens et al., 1998; Tautz et al., 2000). Die Transmembrandomäne von HCV NS4A dient der Verankerung des HCV NS3/4A-Komplexes in der ER-Membran (Brass et al., 2008), wodurch es wahrscheinlich ist, dass für den pestiviralen NS3/4A-Komplex eine vergleichbare Membraneinlagerung erfolgt. Ferner ist die Homodimerisierung von NS4A durch die Transmembrandomäne kritisch für die virale RNA-Replikation und Virionmorphogenese von HCV (Kohlway et al., 2014). Anhand der Kristallstruktur eines Komplexes aus der NS3 Proteasedomäne und eines synthetischen Kofaktor Peptides wurde deutlich, dass ein NS4A Anteil nach der Einlagerung in die NS3 Proteasedomäne eine β -Faltblattstruktur ausbildet, die auch als „Zentralpeptid“ bezeichnet wird (Abb. 2.6 B und C) (Kim et al., 1996).

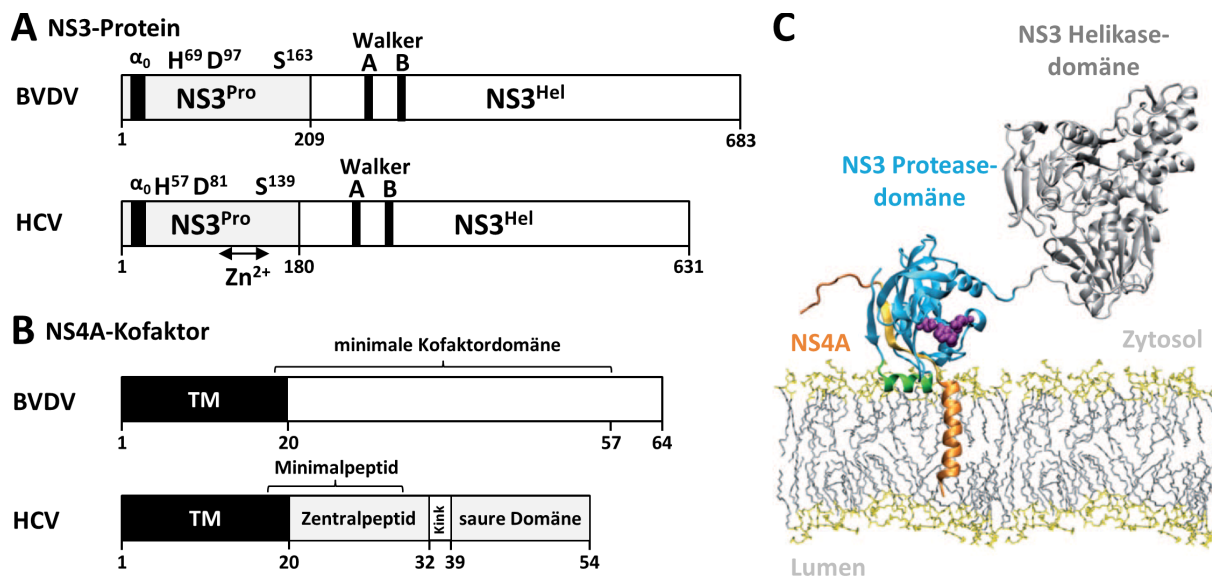


Abb. 2.6: Gegenüberstellung der Proteine NS3 und NS4A von BVDV und HCV sowie die strukturbasierte Darstellung des HCV NS3/4A-Komplexes. (A) Schematische Darstellung von NS3. BVDV- und HCV-NS3 können funktionell und strukturell in die N-terminale NS3 Proteasedomäne (NS3^{Pro}) und die C-terminale NS3 Helikasedomäne (NS3^{Hel}) eingeteilt werden. NS3^{Pro} hat Serinprotease-Aktivität (das jeweilige katalytische Zentrum ist gekennzeichnet). N-terminal ist im NS3 eine α -Helix (α_0) lokalisiert, die den NS3/4A-Komplex an der ER-Membran assoziiert. Die C-terminale Domäne besitzt Helikase- und NTPase-Aktivität. Für diese Funktionen sind das Walker A- (BVDV: GKT²³¹⁻²³³; HCV: GKS²¹⁰⁻²¹²) und Walker B-Motiv (BVDV: DEYH³²¹⁻³²⁴; HCV: DECH²⁹⁰⁻²⁹³) essentiell. Im Vergleich zu BVDV besitzt HCV-NS3 noch ein Zn²⁺-bindendes Motiv (C⁹⁶, C⁹⁸, C¹⁴⁴, H¹⁴⁸). (B) Der NS3-Proteasekofaktor NS4A besteht aus einer Transmembrandomäne (TM-schwarz) sowie einem C-terminalen Anteil, der sich teilweise in die NS3 Proteasedomäne einlagert und somit zur Struktur der Proteasedomäne beiträgt. HCV-NS4A wird in ein sog. Zentralpeptid, eine Kink-Region (engl. „Knick“) und in eine saure Domäne eingeteilt. Für BVDV-NS4A besteht diese exakte Unterteilung bisher noch nicht. Die minimale Kofaktordomäne von BVDV (Tautz et al., 2000) und das Minimalpeptid von HCV (Bartenschlager et al., 1995) sind gekennzeichnet. (C) Modelldarstellung des NS3/4A-Komplexes basierend auf den gelösten Kristallstrukturen von HCV NS3 (PDB 1CU1; Yao et al., 1999) und NS4A (Yao et al., 1999 und für NS4A [1-22] Brass et al., 2008). NS3 Proteasedomäne

(blau), NS3 Helikasedomäne (grau), NS4A (orange). Der NS3/4A-Komplex wird über die NS4A-TM und die NS3 α_0 -Helix (grün) an der ER-Membran verankert. Aminosäureseitenketten der katalytischen Triade der NS3 Protease (violette Kugeln). Abbildung adaptiert nach Brass *et al.* 2008.

Sowohl für BVDV als auch für HCV wurde gezeigt, dass die Einlagerung von NS4A in die NS3 Proteasedomäne essentiell für Spaltung von NS4B/5A und NS5A/5B ist (Bartenschlager *et al.*, 1995; Tautz *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 1997). Experimentell konnte für BVDV-NS4A eine „minimale Kofaktordomäne“ von 39 Aminosäuren (AS 19-57) bestimmt werden (Tautz *et al.*, 2000), während das „Minimalpeptid“ von HCV-NS4A aus 12 Aminosäuren besteht (AS 18-29) (Bartenschlager *et al.*, 1995). HCV-NS4A wird außerdem in eine Kink-Region (engl. für „*Knick*“) (AS 33-39) (Brass *et al.*, 2008) und eine saure Domäne (AS: 40-54) unterteilt (Abb. 2.6 B) (Lindenbach *et al.*, 2007). Die saure Domäne von HCV-NS4A ist wichtig für die NS5A-Hyperphosphorylierung, die RNA-Replikation und in der Virionmorphogenese (Lindenbach *et al.*, 2007; Phan *et al.*, 2011). Das pestivirale NS4A ist im Verbund mit ungespaltenem NS2-3 essentiell für die pestivirale Virionmorphogenese und vermittelt diese vermutlich als **NS2-3/4A-Komplex** im Zusammenspiel mit weiteren Struktur- und Nichtstrukturproteinen. Da Pestiviren den NS3/4A-Komplex im Verbund mit NS4B, NS5A, NS5B und zellulären Faktoren für die RNA-Replikation benötigen, während der NS2-3/4A-Komplex zusammen mit den Strukturproteinen, zellulären Faktoren sowie NS4B, NS5A und NS5B spezifisch zur Virusassemblierung genutzt wird (Agapov *et al.*, 2004; Behrens *et al.*, 1998; Lackner *et al.*, 2004; Moulin *et al.*, 2007), wird der Wechsel von RNA-Replikation zur Virionmorphogenese vermutlich durch die regulierte Zusammenlagerung spezifischer, in der Virionmorphogenese aktiver Proteinkomplexe erreicht, die funktionell auf ungespaltenes NS2-3 angewiesen sind. Die Zusammensetzung dieser Proteinkomplexe und die molekularen Details für eine solche Regulation sind bislang nur unzureichend verstanden, bilden aber die Grundlage für ein besseres Verständnis der pestiviralen Pathogenität.

2.3.6 Zytopathogenität bei Pestiviren

In Zellkultur können zwei pestivirale Biotypen unterschieden werden: der nicht-zytopathogene Biotyp (ncp) und der zytopathogene Biotyp (cp) (Baker, 1987; Tautz *et al.*, 2015). Das Verständnis der Unterschiede dieser beiden Formen ist besonders wichtig im Hinblick auf die pestivirale Pathogenese. Während die intrauterine Infektion (siehe 2.2.3) mit einem ncp-Virus zur Etablierung einer persistenten Infektion (PI) führen kann, resultiert der Biotypenwechsel vom ncp- zum cp-Virus während einer Infektion in der Ausbildung der „Mucosal Disease“ (MD), die i.d.R. zum Tod des infizierten Tieres führt. Dieser Wechsel geschieht spontan und kann erst nach Jahren der persistenten Infektion auftreten. Aus dem an MD erkrankten Tier, lässt sich immer ein eng verwandtes Viruspaar isolieren, das aus dem ncp-Virus und einem veränderten cp-Virus besteht (Becher and Tautz, 2011). Die Ursache für den Biotypenwechsel ist die Veränderung des viralen RNA-Genoms durch RNA-Rekombinationsereignisse, die spontan auftreten und zu einer deregulierten NS2-3-Spaltung und

damit zur gesteigerten Freisetzung von NS3 führen. In der Folge kommt es zu einem massiven Anstieg der RNA-Replikation, die letztlich zur Apoptose und Lyse der infizierten Zelle führt (Becher et al., 2001; Collett et al., 1988b; Corapi et al., 1988; Mendez et al., 1998; Meyers and Thiel, 1996; Vassilev and Donis, 2000). Die MD ist das Resultat einer vermehrten Ausbreitung des cp-Virus innerhalb des infizierten Tieres und des massiven Absterbens der cp-infizierten Zellen. Grundsätzlich sind RNA-Rekombinationen mit viralen- oder zellulären Sequenzen möglich (Becher and Tautz, 2011). Die bisher identifizierten cp-Isolate belegen, dass eine Vielzahl von Genom-Veränderungen toleriert werden können. Aus evolutionärer Sicht ist der Biotypenwechsel jedoch zum Nachteil des Virus, da es die Fähigkeit der Persistenz verliert und es letztlich den Tod des Wirtes herbeiführt, wodurch das Reservoir des Virus verloren geht. Aus diesem Grund sind die meisten cp-Viren nicht in der Lage sich effizient in einer Population auszubreiten.

Die Veränderungen im viralen RNA-Genom, die zu einem cp-Biotyp (deregulierte NS3-Freisetzung) führen, lassen sich in vier Gruppen einteilen (Abb. 2.7):

- Insertion einer zellulären mRNA Sequenz (z.B. Ubiquitin) N-terminal von NS3, die auf Proteinebene als Erkennungssequenz für zellulären Proteasen oder -Hydrolasen dient und dadurch die NS3-Freisetzung bewirkt
- Insertionen kodierender Jiv mRNA Fragmente im viralen Genom führen zur intrinsischen, deregulierten Aktivierung der NS2-Protease und zur NS3-Freisetzung
- Insertionen oder Punktmutationen im NS2 führen zur Jiv-unabhängigen intrinsischen Aktivierung der NS2-Protease, wodurch die konstitutive NS3-Freisetzung resultiert
- Deletionen oder Duplikationen im viralen Genom führen zur Fusionierung von N^{PRO}-kodierender Sequenz an den N-Terminus von NS3 und damit zur permanenten NS3-Freisetzung

Die Insertion von zellulären Ubiquitin oder Ubiquitin-ähnlichen Sequenzen sind häufig in viralen Genomen von cp-Viren zu finden (Meyers and Thiel, 1996). Ubiquitin ist ein hoch konserviertes eukaryontisches Protein, welches als N-terminales Fusionsprotein gebildet wird (Finley et al., 1989; Finley et al., 1987; Redmann and Rechsteiner, 1989). Ubiquitin-C-terminale Hydrolasen (UCH) spalten am C-Terminus von Ubiquitin, wodurch Ubiquitin-Monomere von den Fusionsproteinen freigesetzt werden (Baker et al., 1992; Mayer and Wilkinson, 1989). In der Zelle können Zielproteine mit Ubiquitin markiert werden, was u.a. zum proteasomalen Abbau der Zielproteine führt (Hershko and Ciechanover, 1992). Von zentraler Bedeutung für diese Arbeit ist der cp-Stamm Osloss, der zwischen NS2 und NS3 die Insertion eines Ubiquitin-Monomers aufweist, welches die NS3-Freisetzung durch Ubiquitin-C-terminale Hydrolasen bewirkt (Meyers et al., 1989b; Tautz et al., 1993).

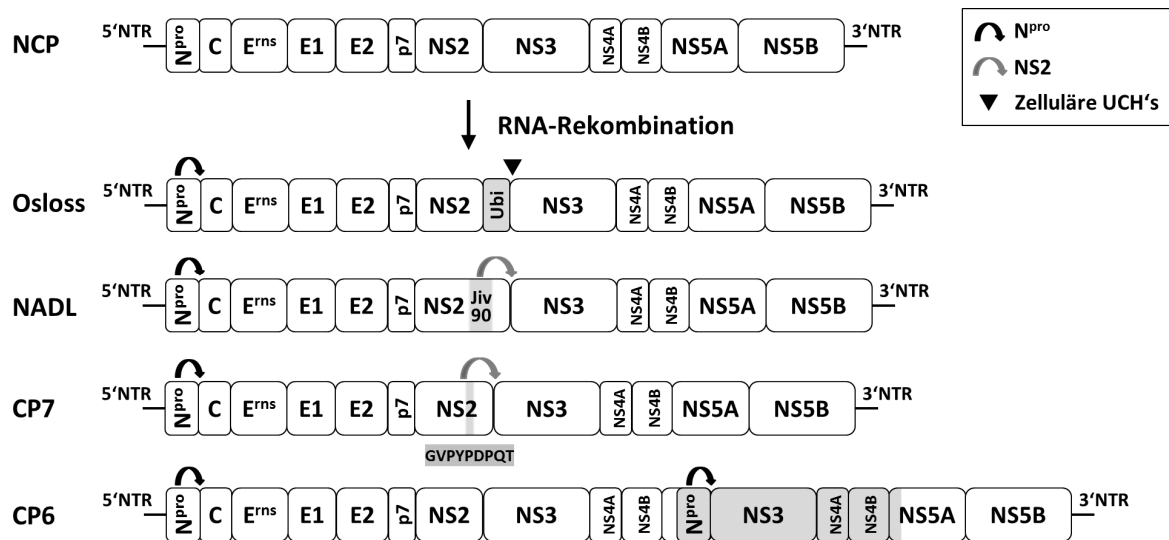


Abb. 2.7: Schematische Darstellung der Genomorganisation verschiedener cp-Virus-Isolate. Durch RNA-Rekombinationsereignisse kommt es zu Genomveränderungen (Insertionen von zellulären Sequenzen bzw. Deletion oder Duplikation von viralen Sequenzen) die zur Bildung eines cp-Virus aus einem ncp-Virus führen (oben, NCP). Alle Veränderungen führen zur unregulierten NS2-3-Spaltung und einer konstitutiven NS3-Freisetzung durch zelluläre Proteasen (z.B. Ubiquitin-Hydrolasen) oder durch virale Proteasen wie z.B. die intrinsische Aktivierung der NS2-Protease oder die N^{pro}-vermittelte NS3-Freisetzung. Schematisch sind die Stämme Osloss (Insertion einer zellulären Ubiquitin (Ubi)-Sequenz), NADL (Insertion eines Fragments (Jiv90) des Jiv-Proteins), CP7 (Duplikation einer viralen Sequenz) und CP6 (Duplikation des Bereiches NS3-4B sowie einem N-terminalem Teil von NS5A, und Fusion von N^{pro} an den N-Terminus der duplizierten NS3-kodierenden Sequenz) dargestellt. Insertionen bzw. Duplikationen sind in grau dargestellt. Die NTR's sind als schwarze Linien dargestellt. Die Proteinspaltungen zur NS3-Freisetzung durch N^{pro}, NS2 und Ubiquitin-C-terminalen Hydrolasen (UCH) sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

In der Folge der deregulierten NS3-Freisetzung kommt es zur verstärkten RNA-Replikation. Für den pestiviralen Replikationszyklus stellt die vollständige Prozessierung von NS2-3 jedoch ein Problem dar, da ungespaltenes NS2-3 essentiell für die Generierung von infektiösen Virionen ist (Agapov et al., 2004; Moulin et al., 2007). Man geht daher davon aus, dass diese cp-Viren für die Verpackung auf Helferviren angewiesen sind, die NS2-3 *in trans* zur Verfügung stellen. Für den BVDV-1 Stamm Osloss konnte diese Abhängigkeit jedoch noch nicht eindeutig belegt werden. Aufgrund dieser Tatsache war das BVDV Isolat Osloss- ein guter Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen zur NS2-3-Abhängigkeit der pestiviralen Virionmorphogenese. Interessanterweise konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass es möglich ist, Pestiviren an eine Virionmorphogenese in Abwesenheit von ungespaltenem NS2-3 (NS2-3-unabhängig) zu adaptieren, wodurch das zentrale Dogma der NS2-3-Abhängigkeit von Pestiviren widerlegt werden konnte. Da dieses Thema zentral für die vorliegende Arbeit ist, wird es in Kapitel 2.5 umfassend eingeleitet.

2.4 Virionmorphogenese bei Pestiviren im Vergleich zu Vertretern der *Flaviviridae*

In der Virionmorphogenese der Vertreter der *Flaviviridae* lagern sich die viralen Strukturproteine mit dem viralen RNA-Genom zu Viruspartikeln zusammen, die letztlich von der infizierten Zelle freigesetzt werden. Diese infektiösen Virionen sind dann in der Lage, naive Wirtszellen zu infizieren.

Pestiviren sind mit intrazellulären Membranen assoziiert (Bielefeldt-Ohmann and Bloch, 1982; Gray and Nettleton, 1987). Studien konnten nahelegen, dass Pestiviren in das ER-Lumen knospen und schließlich über den klassischen sekretorischen Weg, unter der Beteiligung des Golgi-Apparates, aus der Zelle entlassen werden (Grummer et al., 2001; Macovei et al., 2006; Ohmann, 1990; Schmeiser et al., 2014). Allerdings zeigte die Analyse von gereinigten pestiviralen Viruspartikeln, dass sich die Lipidkomposition der Virushülle, mit einem hohen Anteil an Cholesterol und Sphingolipiden, deutlich von der typischen Lipidkomposition von ER-Membranen unterscheidet (Callens et al., 2016). Es ist somit wahrscheinlich, dass während der Virusreifung eine Anreicherung dieser Lipidmoleküle in der Virushülle stattfindet. Vermutlich sind das Kapsidprotein, E^{ns} oder andere NS-Proteine an diesem Prozess beteiligt. Im reifen Viruspartikel sind die viralen Glykoproteine E^{ns}, E1 und E2 in der Virusmembran verankert. Die Analyse der Proteinzusammensetzung von BVDV Partikeln zeigte überraschend eine, im Vergleich zu Flaviviren; relativ geringe Anzahl von viralen Hüllproteinen in den Virionen, vergleichbar mit der von HCV (Callens et al., 2016)(Callens et al., 2016)(Callens et al., 2016)(Callens et al., 2016)(Callens et al., 2016)(Callens et al., 2016)(Callens et al., 2016)(Callens et al., 2016). Interessanterweise ist E^{ns} im Vergleich zu E1 und E2 deutlich überrepräsentiert (Callens et al., 2016), eine Beobachtung, die auch schon durch Immunogoldfärbung von pestiviralen Partikeln mittels Elektronenmikroskopie gemacht wurde (Weiland et al., 1999). Hepaciviren besitzen im Gegensatz zu Pestiviren zwei Glykoproteine (E1, E2), Flaviviren ein Glykoprotein (E). Die virale Kapsidstruktur von Pestiviren hat einen Durchmesser von ca. 25 nm und besitzt, entgegen früherer Annahmen, keine Symmetrie (Ohmann, 1990). Da Core intrinsisch ungeordnet vorliegt, besitzt der Nukleokapsid-Komplex vermutlich eine ebenso ungeordnete Struktur (Ivanyi-Nagy et al., 2008; Murray et al., 2008b). Core ist nicht für alle Mitglieder der *Flaviviridae* essentiell. Während Pesti-, Hepaci- und Flaviviren für Core kodieren, besitzen Pegiviren keine Kapsid-kodierende Sequenz, sind aber dennoch zur effizienten Virusproduktion befähigt (Lindenbach et al., 2013). Pestiviren lassen sich interessanterweise ebenfalls an eine Core-unabhängige Verpackung adaptieren (Riedel et al., 2017; Riedel et al., 2012; Riedel et al., 2010). Die Assoziation der viralen Glykoproteine auf der Virusoberfläche ist für Pesti- und Hepaciviren noch wenig untersucht. Allerdings ist die Heterodimerisierung von E1/E2 bei Pestiviren essentiell für die Infektion, E^{ns} dagegen nicht, was vor dem Hintergrund überraschend ist, dass E1 und E2 im Vergleich zu E^{ns} im Pestiviruspartikel unterrepräsentiert sind (Wang et al., 2004). Im Gegensatz zu Pestiviren liegen die E-Proteine von Flaviviren auf der Virusoberfläche geordnet vor und bilden eine komplexe Struktur (oder

Kapsid) mit ikosaedrischer Symmetrie aus (Rey et al., 1995). Im Gegensatz zu Pestiviren und Hepaciviren, findet bei der Morphogenese von Flaviviren ein zusätzlicher Reifungsschritt im späten Golgi-Kompartiment durch die Protease Furin statt. Dieser induziert eine Konformationsänderung des gesamten Glykoproteinkomplexes der Virusoberfläche und ist essentiell für die Infektiosität (Heinz et al., 1994; Stadler et al., 1997; Yu et al., 2008). Viren des Genus *Flavivirus* können virusähnliche Partikel (engl. *virus like particle*, VLP) bilden, die nur durch die Expression des Glykoproteins induziert werden (Ferlenghi et al., 2001; Russell et al., 1980), vergleichbar zu unbehüllten RNA-Viren, wie dem Maul- und Klauenseuche-Virus (Picornavirus) (Guo et al., 2013) oder dem Norovirus (Calicivirus) (Bertolotti-Ciarlet et al., 2002). Bei Pestiviren und Hepaciviren wurde dies bisher noch nicht beobachtet.

Im Gegensatz zu den Strukturproteinen werden virale Proteine, die nicht im Viruspartikel vorliegen als Nichtstrukturproteine (NS-Proteine) bezeichnet. Eine Besonderheit und Gemeinsamkeit aller Vertreter der *Flaviviridae* ist, dass die Virionmorphogenese nicht nur durch die Strukturproteine, sondern auch durch die Nichtstrukturproteine vermittelt wird (Murray et al., 2008a). Folglich ist für die Virionmorphogenese ein funktionelles Zusammenspiel von Struktur- und Nichtstrukturproteinen wichtig. Dieses Zusammenspiel wird wahrscheinlich durch die Ausbildung von Proteinkomplexen aus Struktur- und NS-Proteinen ermöglicht, die die verschiedenen Schritte in der Virionmorphogenese vermitteln. Während die in der RNA-Replikation aktiven Replikasekomplexe durch die Zusammenlagerung von NS-Proteinen und zellulären Faktoren charakterisiert sind, kommen bei den in der Virionmorphogenese aktiven Verpackungskomplexen noch zusätzliche Interaktionen mit den Strukturproteinen hinzu. Für eine Regulation beider Prozesse auf der Ebene der Protein-Protein Interaktionen in spezialisierten Multiproteinkomplexen sprechen u.a. die Arbeiten von Pietschmann *et al.* mit HCV, in denen Mutationen im NS3 und NS5A identifiziert werden konnten, die die RNA-Replikation durch sog. REM's (engl. *replication enhancing mutations*, REM) verstärken, die sich jedoch im Gesamtlängengenom negativ auf die Virusproduktion auswirken (Pietschmann et al., 2009). Dieses Beispiel zeigt, dass die Zusammensetzung dieser Proteinkomplexe und deren Regulation bisher nur unzureichend untersucht ist und eine genauere Kenntnis der molekularen Grundlagen daher wichtig für das detaillierte Verständnis beider Prozesse ist.

Für Pestiviren konnte bislang gezeigt werden, dass bis auf N^{pro} und NS4B alle NS-Proteine (also p7, NS2-3, NS3, NS4A, NS5A, NS5B) an der Virusbildung beteiligt sind (Agapov et al., 2004; Harada et al., 2000; Isken et al., 2014; Moulin et al., 2007). Untersuchungen an HCV konnten allen NS-Proteinen (einschließlich NS4B) eine Funktion in der Virusassemblierung zuordnen (Gouklani et al., 2013; Gouklani et al., 2012; Han et al., 2013; Jirasko et al., 2008; Jones et al., 2007; Phan et al., 2011; Zayas et al., 2016). Da Pestiviren und HCV sehr nah miteinander verwandt sind, ist es denkbar, dass auch das pestivirale NS4B in bestimmte Prozesse der Virionmorphogenese involviert ist. Die Bildung von viralen

Partikeln läuft in der Zelle in enger Assoziation mit ER-Membranen ab, in denen die viralen Glykoproteine verankert sind, an denen aber auch die RNA-Replikation stattfindet (Gastaminza et al., 2008; Gosert et al., 2003). Somit sind beide Prozesse räumlich eng miteinander gekoppelt (Khromykh et al., 2001; Lindenbach, 2013; Welsch et al., 2009). Neben der Involvierung von ER-Membranen und den dort lokalisierten Glykoproteinen wiesen Studien an HCV auf die Beteiligung von Lipid Droplets (LD, Fettspeicher in der Zelle) an der HCV-Morphogenese hin, wobei an diesen zellulären Strukturen v.a. die viralen Protein Core und NS5A lokalisieren sowie Proteinkomplexe die p7-NS2 oder NS3-4A enthalten (Boson et al., 2011; Counihan et al., 2011; Jirasko et al., 2010; Ma et al., 2011; Phan et al., 2009; Stapleford and Lindenbach, 2011; Zayas et al., 2016). Ferner wurden zelluläre Faktoren identifiziert, die an LD's lokalisieren und für den viralen Replikationszyklus von HCV kritisch sind (Vogt et al., 2013). Für Pestiviren konnte die Lokalisation von NS5A an Lipid Droplets nachgewiesen werden, was eine ähnliche Bedeutung von LD's für die pestivirale Replikation und Virionmorphogenese vermuten lässt (Isken et al., 2014).

Das NS2-Protein besitzt eine zentrale Rolle in der Virionmorphogenese von HCV (Dentzer et al., 2009; Jones et al., 2007; Pietschmann et al., 2006), da es in der Lage ist, sowohl mit Struktur als auch mit NS-Proteinen zu interagieren. Mikroskopische, revers-genetische und biochemische Analysen zeigten, dass NS2 mit E1 und E2 interagiert als auch mit den NS-Proteinen p7, NS3, NS4A, NS5A und NS5B (Dimitrova et al., 2003; Gouklani et al., 2012; Ma et al., 2011; Yi et al., 2007). Man geht heute davon aus, dass NS2 ein Gerüstprotein und eine Plattform für die Virionmorphogenese darstellt (Jirasko et al., 2008; Jirasko et al., 2010; Ma et al., 2011). Es ist möglich, dass NS2 die Glykoproteine an den Ort der Replikation rekrutiert, um die Struktur- und Nichtstrukturproteine sowie das virale RNA-Genom in räumliche Nähe zu bringen. Von wichtiger Bedeutung dürften hierbei die Interaktionen zwischen NS2 und NS3 bzw. NS3-4A sein, da diese essentiell für die Virusbildung von HCV sind (Jones et al., 2011; Phan et al., 2009).

Obwohl sich Pestiviren und Hepaciviren so ähnlich sind, bestehen hinsichtlich der Virusmorphogenese teilweise starke Unterschiede. Ein wesentlicher Unterschied besteht in der essentiellen Rolle von ungespaltenem NS2-3 für die pestivirale Virionmorphogenese. Experimentell wurde dies über die Insertionen einer Ubiquitin-Sequenz oder einer EMCV-IRES zwischen NS2 und NS3 gezeigt, wobei beide Insertionen in der Inhibition der Virionmorphogenese resultierten (Agapov et al., 2004; Moulin et al., 2007). Im Gegensatz dazu ist HCV in Zellkultur nicht auf ungespaltenes NS2-NS3 (Terminus bei HCV) für die Virusproduktion angewiesen (Jirasko et al., 2008; Jones et al., 2007) (siehe Abb. 2.8). Pestiviren benötigen NS4A im Verbund mit NS2-3 für die Virionmorphogenese (Moulin et al., 2007) (siehe 2.3.5). Bei HCV konnte eine essentielle Rolle von NS4A in der Verpackung ebenfalls bestätigt werden (Phan et al., 2011).

von NS2-3 vorliegen. Die Helfervirus-Abhängigkeit des Osloss-Stammes konnte experimentell bisher weder vollständig bewiesen, noch widerlegt werden, da eine Virusisolation mittels Virusplaques bzw. die Generierung eines infektiösen cDNA-Klons nicht erfolgreich waren (Tautz N, persönliche Mitteilung) (Abb. 2.9 – Osloss, Virusproduktion [+]). Die nahe Verwandtschaft von Pestiviren zu HCV sowie die Tatsache, dass die Helfervirus-Abhängigkeit für den BVDV-Stamm Osloss bisher noch nicht eindeutig belegt werden konnte, inspirierten weitere Untersuchungen zur NS2-3-Abhängigkeit von Pestiviren in ihrer Virionmorphogenese. Dazu wurde aus den BVDV-1 Stämmen NCP7 und Osloss ein chimäres Pestivirus (NCP7/Osloss) generiert, das in Abwesenheit von ungespaltenem NS2-3 infektiöse Virionen ausbilden konnte (Lattwein et al., 2012). Für diesen neuen phänotypischen Funktionsgewinn war der Teilbereich NS2-4B* (umfasst NS2, NS3, NS4A sowie die ersten 16 Aminosäuren von NS4B, NS4B*) des Stammes Osloss ausreichend, die Effizienz der Virusproduktion jedoch relativ gering (Abb. 2.9 – NCP7/Osloss, Virusproduktion +). Die Zellkulturpassage dieser NCP7/Osloss-Viruschimäre resultierte in erhöhten Virustitern, die sich auf fünf adaptive Mutationen in dem Virusgenom zurückführen ließ. Als besonders kritisch stellte sich die Mutation R1268Q im NS2 sowie eine Mutation in der 3'NTR heraus, die zusammen einen Titer-Anstieg von $<10^2$ TCID₅₀/ml auf $3,3 \times 10^5$ TCID₅₀/ml ermöglichten. Weitere Mutationen im E^{ns}, E2 sowie p7 erhöhten die Effizienz der Virusproduktion um zwei log₁₀-Stufen auf $2,1 \times 10^7$ TCID₅₀/ml (Lattwein et al., 2012). Durch diese Studie konnte erstmals das bisherige Dogma widerlegt werden, dass Pestiviren, im Gegensatz zu HCV, auf ungespaltenes NS2-3 für Virusassemblierung angewiesen sind.

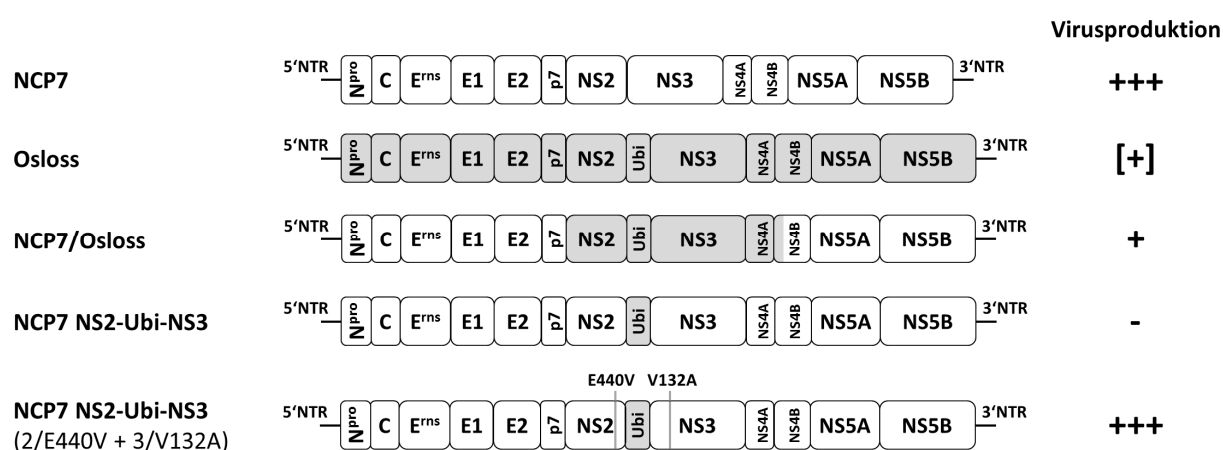


Abb. 2.9: NS2-3-unabhängige Virionmorphogenese bei Pestiviren. Genomorganisation der BVDV-1 Stämme NCP7 (Proteine weiße Boxen) und Osloss (Proteine graue Boxen) sowie deren Derivate bzw. Viruschimären. Der Stamm Osloss weist zwischen NS2 und NS3 die Insertion eines bovinen Ubiquitin-Monomers auf, wobei das Osloss-spezifische Ubiquitin zwei Aminosäureaustausche im Vergleich zum authentischen bovinen Ubiquitin aufweist (T55G und G76S). Die Abbildung fasst die wesentlichen Erkenntnisse zur NS2-3-unabhängigen Virionmorphogenese (jeweils mit Ubi-Insertion) schematisch zusammen (Klemens et al., 2015; Lattwein et al., 2012). Die Befähigung zur Virionmorphogenese des entsprechenden Virus, Derivats bzw. der Viruschimäre ist schematisch dargestellt: effizient (+++), geringfügig (+), bisher nicht eindeutig gezeigt ([+]), nicht befähigt (-).

Der BVDV-Stamm Osloss und der Stamm NCP7 unterscheiden sich, neben der Osloss-spezifischen Ubiquitin-Insertion zwischen NS2 und NS3, in insgesamt 48 Aminosäurepositionen im Teilbereich NS2-4B*. Durch die Generierung weiterer NCP7/Osloss-Chimären, in denen Teile des Osloss NS2-4B* Bereiches durch NCP7-Sequenzen ausgetauscht wurden, sollten die minimal benötigten Determinanten für die pestivirale NS2-3-unabhängige Virionmorphogenese identifiziert werden. Auf diese Weise konnten die Aminosäureaustausche E440V in der NS2 Proteasedomäne und V132A in der NS3 Proteasedomäne identifiziert werden, die essentiell und ausreichend für die Virionmorphogenese ohne ungespaltenes NS2-3 sind (Klemens et al., 2015). In dem monocistronischen Virusderivat NCP7 NS2-Ubi-NS3 ermöglichten die Austausche 2/E440V und 3/V132A die effiziente NS2-3-unabhängige Virionmorphogenese (Abb. 2.9 – NCP7 NS2-Ubi-NS3 (2/E440V + 3/V132A), Virusproduktion +++). Umfangreiche Permutationsanalysen an den Positionen 440 (NS2) und 132 (NS3) belegten, dass die Aminosäureidentität an der Position 132 (NS3) besonders kritisch für die Funktion in der Virusassemblierung ist.

Diese Erkenntnisse konnten auch auf ein bicistronisches Virus NCP7 NS2-IRES-NS3 übertragen werden. Die Partikelproduktion ist in diesem bicistronischen Kontext allerdings wesentlich ineffizienter. Durch die Zellkulturpassage von NCP7 NS2-IRES-NS3 (2/E440V + 3/V132A) konnten drei weitere kompensatorische Mutationen in E2 (214/+K), NS2 (T269A) sowie in NS5B (E641G) identifiziert werden, die den Virustiter Virionmorphogenese-spezifisch erhöhten (Klemens et al., 2015).

2.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Beobachtung, dass sich Pestiviren an eine Virionmorphogenese adaptiert lassen, die effizient NS2 und NS3 statt ungespaltenem NS2-3 für die Bildung infektiöser Virionen ausnutzt, bildet den Ausgangspunkt für die hier vorgestellte Studie. Die essentiellen Determinanten für diesen neuen Phänotyp der NS2-3-unabhängigen Virionmorphogenese bilden die Aminosäureaustausche E440V in der NS2 Proteasedomäne und V132A in der NS3 Proteasedomäne. Über die molekularen Grundlagen der NS2-3-unabhängigen Verpackung ist bisher noch wenig bekannt.

In der vorliegenden Arbeit sollte der molekulare Mechanismus aufgeklärt werden, der es Pestiviren ermöglicht NS2-3-unabhängig Virionen zu generieren. Da für das pestivirale NS2 bisher noch keine Kristallstruktur existiert, sollte der Fokus der Arbeit auf der Identifikation der Rolle des Aminosäureaustausches V132A im NS3 liegen. In Vorarbeiten wurde durch Maria-Alejandra Tortorici und Félix A. Rey (Institut Pasteur, Paris, Frankreich) die Kristallstruktur des pestiviralen NS3/4A-Komplexes ermittelt. Vorläufige Untersuchungen dieser Struktur ergaben, dass die Aminosäure 132 an einem Oberflächenareal der NS3 Proteasedomäne lokalisiert ist, welches Kontakt zu dem C-terminalen Bereich des Kofaktors NS4A hat. Es sollte untersucht werden, ob die Aminosäure 132 funktionell

wichtige Interaktionen mit dem C-terminalen Bereich von NS4A eingeht. Da der NS3/4A-Komplex kritisch für die Polyproteinprozessierung ist und zugleich einen essentiellen Bestandteil der viralen Replikase darstellt, sollte bestimmt werden, ob die Interaktion zwischen der NS3 Proteasedomäne und NS4A eine kritische Bedeutung in diesen Prozessen besitzt. Diese Untersuchungen sollten im letzten Teil der Arbeit auf die NS2-3-unabhängige Virionmorphogenese ausgeweitet werden. Es sollte überprüft werden, ob spezifische Interaktionen zwischen der NS3 Proteasedomäne und dem C-terminalen Anteil von NS4A zur Ausbildung funktionell unterschiedlicher Proteinkomplexe führen, die Prozesse wie Polyproteinprozessierung, RNA-Replikation bzw. die NS2-3-unabhängige Virionmorphogenese regulieren.

Somit dienen die geplanten Studien dem Ziel, die molekularen Grundlagen der NS2-3-unabhängigen Virionmorphogenese besser zu verstehen. Die Erkenntnisse dieser Untersuchungen sollen dem besseren Verständnis der pestiviralen Virionmorphogenese dienen und helfen die viralen Proteinkomplexe zu identifizieren und zu charakterisieren, die an der Virusassemblierung beteiligt sind.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Tabelle 3.1 Liste der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
³⁵ S-Methionin und ³⁵ S-Cystein	Hartman Analytic, Braunschweig
AccuGENE™ PBS	Lonza, Basel, Schweiz
Acrylamid 4K-Lösung (40%), 29:1	Applichem, Darmstadt
Agarose Low melt	Roth, Karlsruhe
Agarose ultraPURE™	Life Technologies (Invitrogen), Darmstadt
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Bovines Serum-Albumin (BSA)	NEB, Schwalbach
DMEM	Life Technologies (Gibco), Darmstadt
DMEM ohne Methionin, Cystein und Glutamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
dNTPs	Life Technologies (Invitrogen), Darmstadt
ddH ₂ O (doppelt destilliertes Wasser)	Roth, Karlsruhe
DPBS	Life Technologies (Gibco), Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Fötale Kälberserum Gold	PAA, Cölbe
GeneRuler™ 1 kb Plus DNA-Leiter	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Geneticin (G418)	PAA, Cölbe
GlutaMAX™	Life Technologies (Gibco), Darmstadt
Glycin	Biomol, Hamburg
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
LB-Agarose	Roth, Karlsruhe
LB-Medium	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
MEM (Minimal Essential Medium)	PAA, Cölbe Life Technologies (Gibco), Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
Methafectene	Biontex, München
Midori Green Advance	Nippon Genetics Europe, Düren
Natrium-Desoxycholat	Roth, Karlsruhe
Nicht essentielle Aminosäuren	PAA, Österreich
N-Octyl-β-D-glucopyranosid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Oligonukleotide	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, St. Leon-Roth
Paraformaldehyd	Affymetrix, Santa Clara (CA), USA
Pefabloc als Serinprotease-Inhibitor	Roth, Karlsruhe
Penicillin / Streptomycin	PAA, Cölbe
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Pferdeserum	PAA, Cölbe

Polyethylenimin (PEI MAX 40,000)	Polysciences, Hirschberg an der Bergstrasse
Ponceau Rot	Serva, Heidelberg
Probenpuffer 6x	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Protein-A-Sepharose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protein-G-Sepharose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TAE-Puffer	Merck Millipore, Darmstadt
Trichlormethan/Chloroform	Roth, Karlsruhe
X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid)	ICN, Eschwege

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3.2 Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Axygen PCR-05-C tubes	Corning Inc., Corning (NY), USA
Elektroporationsküvetten (2 mm)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Gewebekulturgefäße Cellstar® (10 cm Schalen; 6-, 12-, 24-, 48-, 96-Well)	Greiner Bio-One, Frickenhausen TPP, Trasadingen, Schweiz
Nitrozellulose-Membran	Pall Life Sciences, Port Washington (NY), USA
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Plastikspritzen	Braun, Melsungen BD Falcon, Franklin Lakes (NJ), USA
Reaktionsgefäße (0,5, 1,5 und 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße für PCR-Anwendungen	Biozym, Hessisch Oldendorf
Sterilfilter Minisart™ (0,2 μ m)	Sartorius, Göttingen
Zellschaber S (240 mm)	TPP, Trasadingen, Schweiz

3.1.3 Geräte

Tabelle 3.3 Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
Absaugeinrichtung	KNFLab Laboport, Freiburg
Brutschränke für Bakterienkulturen	Bachofen, Basel
Brutschränke mit CO ₂ -Begasung Labotect Incubator (C200, C42)	Labotect, Göttingen
Digitalkamera AxioCam	Zeiss, Jena
Drehrad	NeoLab, Heidelberg
Elektroporationsapparatur (GenePulserII Xcell)	BioRad, München
Fluoreszenz-Mikroskope (Axiovert 35; Axio Observer Z.1)	Zeiss, Jena
Gelelektrophoresekammern für Agarosegele	Werkstatt des MZI, JLU Gießen
Gelelektrophoresekammern für SDS-PAGE (Mini-PROTEAN® Tetra Cell; Hoefer (SE600))	BioRad, München Hoefer, Holliston (MA), USA
Glaswaren	Schott, Mainz
Heizblöcke	Eppendorf, Hamburg
Image Analyzer (LAS-4000mini)	Fujifilm, Düsseldorf

Lichtmikroskop	Zeiss, Jena
Luminometer (Junior LB9509)	Berthold, Bad Wildbad
Minishaker (Vibrax VXR)	IKA, Staufen
NanoDrop 2000c UV/VIS Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Nass-Blot-Apparatur (Mini-PROTEAN® Tetra Cell)	BioRad, München
Odyssey® CLx Imaging System	LI-COR®, Lincoln (NE), USA
Phosphorimager (Typhoon, FLA-7000)	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg
Pipetten (10, 100, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipetten (Mehrkanal)	
Manuell	Eppendorf, Hamburg
Vollautomatisch, e1200	Sartorius, Göttingen
Halbautomatisch, PreCision®	Biozym, Hessisch Oldendorf
Pipettierhilfe (PipetBoy Acu)	Integra Biosciences, Fernwald
Schüttler für Bakterienkulturen (HT Multitron)	Infors HT, Bottmingen, Schweiz
Spannungsquellen	
P25	Biometra, Göttingen
PowerPac Basic; PowerPac HC	BioRad, München
Sterilbank	
MSC advance	Thermo Scientific, Schwerte
BSC-EN-2-6 120	Zapf Nuaire, Plymouth, USA
Thermocycler Finnzymes pico	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Tischzentrifuge (1,5 und 2 ml) 5415D	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge (15 und 50 ml) 5804R	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
UV-Tisch 254 nm (Fluo_Link)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
UV-Tisch 312 nm	UVP, Upland (CA), USA
Vortexer	IKA, Staufen
Waagen	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zentrifuge Avanti	Beckmann Coulter, Krefeld

3.1.4 Enzyme

Tabelle 3.4 Liste der verwendeten Enzyme

Enzym	Hersteller
Alkalische Phosphatase (CIP)	NEB, Schwalbach
Klenow Fragment	NEB, Schwalbach
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Restriktionsendonukleasen	NEB, Schwalbach
RNase A	Roche, Mannheim
T4 DNA-Ligase	NEB, Schwalbach
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	NatuTec, Frankfurt
Trypsin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

3.1.5 Kits

Tabelle 3.5 Liste der verwendeten Kits

Kit	Hersteller
MAXIscript™ SP6 zur <i>in vitro</i> Transkription	Life Technologies, Darmstadt
MAXIscript™ T7 zur <i>in vitro</i> Transkription	Life Technologies, Darmstadt
Montage™ DNA Gel Extraction Kit zur Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	Merck Millipore, Darmstadt
Nucleobond® AX 100 Säulen zur DNA Präparation aus Bakterien	Macherey-Nagel, Düren
pGEM®-T Vektor System I zur Klonierung von PCR-Produkten	Promega, Madison (WI), USA
Qiaquick® Gel Extraction Kit zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	Qiagen, Hilden
Renilla Glow Juice	PJK, Kleinbittersdorf

3.1.6 Geräte

Tabelle 3.6 Liste der verwendeten Primärantikörper

Primärantikörper	Beschreibung
anti-GST (26H1)	Monoklonaler Antikörper aus der Maus; gerichtet gegen GST (NEB/Cell Signaling Technology, Frankfurt)
anti-HA.11 (16B12)	Monoklonaler Antikörper aus der Maus; gerichtet gegen das HA-Epitop; Covance, Princeton (NJ), USA
anti-HA (C29F4)	Monoklonaler Antikörper aus dem Kaninchen; gerichtet gegen das HA-Epitop; (NEB/Cell Signaling Technology, Frankfurt)
anti-myc (9B11)	Monoklonaler Antikörper aus der Maus; gerichtet gegen das myc-Epitop; (NEB/Cell Signaling Technology, Frankfurt)
anti-E2 (SCR48 6.6.11)	Monoklonaler Antikörper aus der Maus; gerichtet gegen das E2 Protein von BVDV; das Hybridom wurde von Heinz-Jürgen Thiel zur Verfügung gestellt (Institut für Virologie, JLU Gießen) (Weiland et al., 1990)
anti-NS3/NS2-3 (mAk 8.12.7)	Monoklonaler Antikörper aus der Maus; gerichtet gegen NS3/NS2-3; erkennt ein Epitop im viralen NS3 und NS2-3 Protein, das bei allen bisher untersuchten Spezies Genus <i>Pestivirus</i> erkannt wird; Zur Verfügung gestellt von E. J. Dubovi (New York State College of Veterinary Medicine, Cornell University Ithaca (NY), USA (Corapi et al., 1990)
anti-NS4A (GH4A1 [4B7])	Monoklonaler Antikörper aus der Maus; gerichtet gegen CSFV NS4A und kreuzreaktiv für BVDV NS4A (Lamp et al., 2011)
anti-NS5A (GLBVD5A1 [11C])	Monoklonaler Antikörper aus der Maus; gerichtet gegen CSFV NS5A und kreuzreaktiv für BVDV NS5A (Lamp et al., 2011)
anti-NS5B (GLBVD5B1 [9A])	Monoklonaler Antikörper aus der Maus; gerichtet gegen CSFV NS5A und kreuzreaktiv für BVDV NS5A (Lamp et al., 2011)

Tabelle 3.7 Liste der verwendeten Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Beschreibung
anti-Maus IgG Cy3-konjugiert	Monoklonaler Antikörper aus der Ziege; gerichtet gegen IgG der Maus; Cy3 konjugiert (Dianova, Hamburg)
anti-Maus IgG HRP-konjugiert	Monoklonaler Antikörper aus der Ziege; gerichtet gegen IgG der Maus; Meerrettich-Peroxidase konjugiert (Dianova, Hamburg)
anti-Rabbit IgG (H+L), HRP-konjugiert	Monoklonaler Antikörper aus der Ziege; gerichtet gegen IgG des Kaninchens; Meerrettich-Peroxidase konjugiert (Dianova, Hamburg)
IRDye® 800CW Donkey-anti-Mouse	Monoklonaler Antikörper aus dem Esel; gerichtet gegen IgG der Maus; IRDye® 800CW konjugiert (LI-COR® Biosciences, Lincoln (NE), USA)

3.1.7 PCR Primer

Tabelle 3.8 Liste der verwendeten Sequenzierprimer (sense)

Name	Sequenz
BVDV 1 se	gtatacagaggttaggcaagttc
BVDV 500 se	cctttgttggagaaagaggag
BVDV 1.000 se	ccgccagatgctacgatagtg
BVDV 1.500 se	gaataaaactcaggccaacc
BVDV 2.000 se	atggtaaatactgcatgagatg
BVDV 2.500 se	ccggctttcatacgccatag
BVDV 3.000 se	tgcttaggaggaattggac
BVDV 3.500 se	cttcgctgagtcctgttggtg
BVDV 4.000 se	tatgtgacagactacttcagg
BVDV 4.500 se	gaatatcagcactactctgcc
BVDV 5.000 se	aaggtaacttgaaggacccttc
BVDV 5.500 se	cagaatatggtgtcaagacgg
BVDV 6.000 se	caagtatctccttaacctgag
BVDV 6.500 se	gaccagctaacttgagagtgg
BVDV 7.000 se	ccaagtcctgtgctgttccc
BVDV 7.500 se	ggattgaatttcgtaaggtcc
BVDV 8.000 se	tacaaaactcaatctcaataag
BVDV 8.500 se	gtcctggattgatctacagcc
BVDV 9.000 se	tgcaactatacaaaaaatacag
BVDV 9.500 se	gccctttgttagtctctgggc
BVDV 10.000 se	aggagctattgctacgttgcc
BVDV 10.500 se	gaatgaaaatcagcagagcccag
BVDV 11.000 se	aagtaactagtagagatctacg
BVDV 11.500 se	caccagcagttacatggccggc
BVDV 12.000 se	agtcacgggagtagggacggag
BVDV 12.300 se	gggaagacccttaacagccc
Cite100	caaaggaatgcaaggtctgttg
Cite440	ggggacgtggttttccttg
M13	gtaaaacgacggccat
T7for	aaattaatacgaactactatagg

Tabelle 3.9 Liste der verwendeten Sequenzierprimer (antisense)

Name	Sequenz
BVDV 500 ase	ctcctctttctccaacaagg
BVDV 1.000 ase	ccactatcgtagcatctggcgg
BVDV 1.500 ase	aaggttggcctgagttttattc
BVDV 2.000 ase	catctcatgcagtattttaccatc
BVDV 2.500 ase	ctatggcgtatgaaaagccgg
BVDV 3.000 ase	gtccaattccctcctaaggcac
BVDV 3.500 ase	caccaacagggactcagcgaag
BVDV 4.000 ase	cctgaagtagtctgtcacataac
BVDV 4.500 ase	ggcaagagtagtctgatattc
BVDV 5.000 ase	gaagggtcctcaagttaccttc
BVDV 5.500 ase	ccgtcttgacacatattctg
BVDV 6.000 ase	ctcaggttaaaggagatacttg
BVDV 6.500 ase	ccactctcaagtttagctgggtc
BVDV 7.000 ase	gggaacagcacagggacttgg
BVDV 7.500 ase	ggaccttacgaaattcaatcc
BVDV 8.000 ase	cttattgagaggttaagttttg
BVDV 8.500 ase	ggctgtagatcaaatccaggac
BVDV 9.000 ase	ctgtattttttgttatagttgcac
BVDV 9.500 ase	gcccaggactagaacaaagggc
BVDV 10.000 ase	ggcaacgtagcaatagctcctc
BVDV 10.500 ase	ctgggctctgctgattttcattc
BVDV 11.000 ase	cgtagatctctactagtacttg
BVDV 11.500 ase	gccggccatgtaactgctggtg
BVDV 12.000 ase	ctccgtccctactcccgtgactg
BVDV 12.300 ase	gggctgtaagggtcttccc
EMCV IRES rev	ctaggaatgctcgtcaag
M13 rev	ggaaacagctatgacat

Tabelle 3.10 Liste der verwendeten QuikChange Primerpaare (durch QuikChange PCR veränderte Kodons sind grau hinterlegt)

Name	Sequenz
NS4A (L45A) se	gactagaggacacaacccacgctcaatatgcgcccaatgccataag
NS4A (L45A) ase	cttatggcattgggcgcatattgagcgtgggttgtgtcctctagtc
NS4A (Y47A) se	gaggacacaacccaccttcaagctgcgcccaatgccataagaactg
NS4A (Y47A) ase	cagttcttatggcattgggcgagccttgaagggtgggttgtgtcctc
NS4A (L45-Y47-AA) se	agaggacacaacccacgctcaagctgcgcccaatgccataagaactg
NS4A (L45-Y47-AA) ase	cagttcttatggcattgggcgagccttgaagcgtgggttgtgtcctc
NS4A TEV (L45A) se	gactagaggacacaacccacgcccaatatgcgcccgagaacctttacttcc
NS4A TEV (L45A) ase	ggaagtaaaggttctcgggcgcatattgggcgtgggttgtgtcctctagtc
NS4A TEV (Y47A) se	gactagaggacacaacccaccttcaagccgcgcccgagaacctttacttccagg
NS4A TEV (Y47A) ase	cctggaagtaaaggttctcgggcgaggccttgaagggtgggttgtgtcctctagtc
NS4A TEV (L45-Y47-AA) se	gactagaggacacaacccacgcacaagccgcgcccgagaacctttacttccagg
NS4A TEV (L45-Y47-AA) ase	cctggaagtaaaggttctcgggcgaggccttgtcgtgggttgtgtcctctagtc

Tabelle 3.11 Liste der verwendeten PCR Primer für die spezifische Amplifikation bestimmter Bereiche bzw. die Generierung von Inserts mittels Oligo-Annealing

Name	Sequenz
Ubi (NcoI) se	ccatggagatcttctgtgaaaac
NCP7 NS3 (AgeI) ase	gtaagcccaa-ccggtttccaatcc
NS3 (BlnI) se	ctgtgggcgaacaggctcagcgg
NS4A _(P49) -TEV (KasI)	ggcgccctggaagtaaaggttctcggcgcatattgaaggtggg
GST (KasI) se	ggcgctcccctatactagg
GST (PstI) ase	ctgcagtcagtcacgatgaattc
Ubi-NS2	ctccgtctccgcggtggtgaaccaggcgcccaggggtacc
NS3-4A(P)-TEV se	gtgctcgactccgcgaggacactgccgtgtgcaag
NS3-4A(P)-TEV ase	taatggcgccctggaagtaaaggttctcggcgcatattgaaggtggg
HA-TEV se	taatgacgtgccaccatgggctcataccatgatgtccggattatgctggatccggagaaagcttatta
HA-TEV ase	taataagctttctcggatccagcataatccggaacatcatatgggtatgagcccatggtggcgacgtcatta

3.1.8 Plasmide

Tabelle 3.12 Liste der verwendeten Basisplasmide

Name	Beschreibung
pBlueskript SK-	Wurde für die Generierung von Subklonen verwendet (Agilent Technologies, La Jolla (CA), USA)
pCITE-2a	Wurde für die Generierung von Subklonen, sowie als Expressionsvektor für T7-Vaccinia Expressionen verwendet (Merck, Darmstadt)
pGEM-T	Zur Klonierung von PCR-Produkten mit A-Überhängen (Promega, Madison (WI), USA)
pET11b	Wurde für die Expression von CSFV NS4A ₃₇ NS3 verwendet

Tabelle 3.13 Liste der verwendeten viralen Subklone

Name	Beschreibung
pGEM-T (NcoI)-Ubi NS3-(AgeI)	Vorklon zur Generierung von pCITE Ubi-NS3-4A ₍₁₋₄₉₎ -TEV-GST und Varianten; generiert mit den Primern Ubi (NcoI) se und NCP7 NS3 (AgeI) ase auf dem DNA-Template pLucubi-G1590 (Tautz and Thiel, 2003)
pGEM-T (BlnI)-NS3-NS4A _(P49) -TEV-(KasI)	Vorklon zur Generierung von pCITE Ubi-NS3-4A ₍₁₋₄₉₎ -TEV-GST und Varianten; generiert mit den Primern NS3 (BlnI) se und NS4A _(P49) -TEV (KasI) auf dem DNA-Template pNCP7
pGEM-T (KasI)-GST-(PstI)	Vorklon zur Generierung von pCITE Ubi-NS3-4A ₍₁₋₄₉₎ -TEV-GST und Varianten; generiert mit den Primern: GST (KasI) se und GST (PstI) ase auf dem DNA-Template pCITE GST (Labor Tautz)
pGEM-T (-) NS3 4A Stopp <i>SacI</i> - <i>SbfI</i>	Kodiert den Teilbereich von <i>SacI</i> bis <i>SbfI</i> des Konstruktes pCITE NCP7 E2-4A, generiert mittels <i>SacI</i> und <i>SbfI</i>
pSK(-) NCP7 <i>SacI</i> - <i>Sall</i>	Kodiert für den Teilbereich von <i>SacI</i> bis <i>Sall</i> des Stammes NCP7/CP7; diente als DNA-Template zum Einbringen von Punktmutationen in diesen Bereich, generiert mittels <i>SacI</i> und <i>Sall</i>

Tabelle 3.14 Liste der verwendeten viralen Expressionskonstrukte

Name	Beschreibung
pET 11 NS4A ₃₇ NS3 (3/S163A)	Expressionskonstrukt, welches für ein artifiziell aufgebautes Polyprotein der CSFV NS-Proteine NS3 und NS4A, sowie für diverse Protein-Tags kodiert; das exprimierte Polyprotein ist wie folgt aufgebaut: His-Tag (7xHis), TEV-Spaltstelle (ENLYFQG), NS4A (AS: 21-57), GSGS-Linker, NS3 (AS: 1-683) und NS4A (AS: 1-8); die Transkription ist durch einen T7-Promotor reguliert; enthält die Mutation S163A in NS3, wodurch die NS3 Protease inaktiviert wird, generiert von M. Alejandra Tortorici (Dubrau et al., 2017)
pET 11 NS4A ₃₇ NS3	Derivat des pET 11 NS4A ₃₇ NS3 (3/S163A); kodiert die proteolytisch aktive Form (S163); generiert von M. Alejandra Tortorici (Dubrau et al., 2017)
pCITE BVDV NS5A-NS5B-myc	Expressionskonstrukt welches das BVDV-1 Polyprotein NS5A-5B kodiert; NS5B enthält C-terminal einen myc-Tag (EQKLISEEDL) (Tautz et al., 2000)
pGEM-T HA-TEV ^{pro}	Kodiert TEV-Protease, die N-terminal einen HA-tag enthält; generiert mit dem Vektor HA-TEV ^{pro} (Dissertation Langerwisch, 2015) und Insert aus den Primern HA-TEV se und HA-TEV ase (Insert hergestellt über Oligo-Hybridisierung) über <i>AatII</i> und <i>HindIII</i>
pCITE Ubi-NS3-4A ₍₁₋₄₉₎ -TEV-GST	Expressionskonstrukt, welches ein artifiziell aufgebautes Polyprotein kodiert; bestehend aus: bovinem Ubiquitin, BVDV NS3 (AS: 1-683), BVDV NS4A (AS: 1-49), TEV-Spaltstelle (ENLYFQG) und GST; generiert mithilfe des Basisplasmids pCITE-2a und den viralen cDNAs/Subklonen: pGEM-T (<i>NcoI</i>)-Ubi NS3-(<i>AgeI</i>), pNCP7; pGEM-T (<i>BlnI</i>)-NS3-NS4A _(p49) -TEV-(<i>KasI</i>) und pGEM-T (<i>KasI</i>)-GST-(<i>PstI</i>) unter Verwendung von den Restriktionsenzymen <i>NcoI</i> , <i>AgeI</i> , <i>BlnI</i> , <i>KasI</i> und <i>PstI</i>
pCITE Ubi-NS3-4A ₍₁₋₄₉₎ -TEV-GST (3/V132A)	Derivat des pCITE Ubi-NS3-4A ₍₁₋₄₉₎ -TEV-GST; trägt die Mutation V132A in NS3; generiert mithilfe des <i>AgeI</i> - <i>BlnI</i> Fragments aus pT7-DI-388 (3/V132A)
pCITE Ubi-NS3-4A ₍₁₋₄₉₎ -TEV-GST (4A/L45A)	Derivat des pCITE Ubi-NS3-4A ₍₁₋₄₉₎ -TEV-GST; trägt die Mutation L45A in NS4A; generiert mithilfe des <i>BlnI</i> - <i>KasI</i> Fragments aus pGEM-T (<i>BlnI</i>)-NS3-NS4A _(p49) -TEV-(<i>KasI</i>) (4A/L45A)
pCITE Ubi-NS3-4A ₍₁₋₄₉₎ -TEV-GST (4A/Y47A)	Derivat des pCITE Ubi-NS3-4A ₍₁₋₄₉₎ -TEV-GST; trägt die Mutation L45A in NS4A; generiert mithilfe des <i>BlnI</i> - <i>KasI</i> Fragments aus pGEM-T (<i>BlnI</i>)-NS3-NS4A _(p49) -TEV-(<i>KasI</i>) (4A/Y47A)
pCITE Ubi-NS3-4A ₍₁₋₄₉₎ -TEV-GST (4A/L45-Y47-AA)	Derivat des pCITE Ubi-NS3-4A ₍₁₋₄₉₎ -TEV-GST; trägt die Mutation Y47A in NS4A; generiert mithilfe des <i>BlnI</i> - <i>KasI</i> Fragments aus pGEM-T (<i>BlnI</i>)-NS3-NS4A _(p49) -TEV-(<i>KasI</i>) (4A/L45-Y47-AA)
pCITE p7-NS2-3-4A ₍₁₋₄₉₎ -TEV-GST	Derivat des pCITE Ubi-NS3-4A ₍₁₋₄₉₎ -TEV-GST; kodiert den Genbereich p7-NS2-3 des BVDV-1 Stammes NCP7; generiert mithilfe des <i>KpnI</i> - <i>EcoRV</i> Fragments von pCITE p7-NS2 (Dissertation Klemens O., 2014)
pCITE NCP7 E2-4A (NS2-3)	Kodiert den E2-4A-Bereich des BVDV-1 Stammes NCP7; Konstrukt ist identisch zu pN/E2-4A (Rinck et al., 2001)
pCITE NCP7 E2-4A (NS2-Ubi-NS3)	Derivat des pCITE NCP7 E2-4A; enthält den Ubiquitin-kodierenden Bereich des BVDV-1 Stammes Osloss zwischen den kodierenden Regionen von NS2 und NS3 (Aminosäureaustausch G76S); die NS2-Protease ist durch die

	Deletion von C376 (C1512 im Polyprotein) inaktiviert; generiert mithilfe des <i>NotI</i> -AgeI Fragments aus pNCP7 NS2-Ubi-NS3
pCITE NCP7 E2-4A (NS2-Ubi-NS3) (2/E440V)	Derivat des pCITE NCP7 E2-4A (NS2-Ubi-NS3), trägt die Mutation E440V in NS2; generiert mithilfe des <i>NotI</i> - <i>BlnI</i> Fragments aus pNCP7 NS2-Ubi-NS3 (2/E440V)
pCITE NCP7 E2-4A (NS2-Ubi-NS3) (2/E440V + 3/V132A)	Derivat des pCITE NCP7 E2-4A (NS2-Ubi-NS3), trägt die Mutationen E440V in NS2 und V132A in NS3; generiert mithilfe des <i>NotI</i> - <i>BlnI</i> Fragments aus pNCP7 NS2-Ubi-NS3 (2/E440V + 3/V132A)
pCITE NCP7 E2-4A (NS2-Ubi-NS3) (2/E440V + 4A/L45A)	Derivat des pCITE NCP7 E2-4A (NS2-Ubi-NS3) (2/E440V), trägt die Mutationen E440V in NS2 und L45A in NS4A; generiert mithilfe des <i>BlnI</i> - <i>SbfI</i> Fragments aus pGEM-T (-) NS3 4A Stopp <i>SacI</i> - <i>SbfI</i> (4A/L45A)
pCITE NCP7 E2-4A (NS2-Ubi-NS3) (2/E440V + 4A/Y47A)	Derivat des pCITE NCP7 E2-4A (NS2-Ubi-NS3) (2/E440V), trägt die Mutationen E440V in NS2 und Y47A in NS4A; generiert mithilfe des <i>BlnI</i> - <i>SbfI</i> Fragments aus pGEM-T (-) NS3 4A Stopp <i>SacI</i> - <i>SbfI</i> (4A/Y47A)
pCITE NCP7 E2-4A (NS2-Ubi-NS3) (2/E440V + 4A/L45-Y47-AA)	Derivat des pCITE NCP7 E2-4A (NS2-Ubi-NS3) (2/E440V), trägt die Mutationen E440V in NS2 und Y47A in NS4A; generiert mithilfe des <i>BlnI</i> - <i>SbfI</i> Fragments aus pGEM-T (-) NS3 4A Stopp <i>SacI</i> - <i>SbfI</i> (4A/L45-Y47-AA)

Tabelle 3.15 Liste der verwendeten BVDV-Replikons

Name	Beschreibung
pT7-DI-388	BVDV-Replikon, welches auf pDI-388 basiert (Tautz et al., 1999). Kodiert für die BVDV-1 Proteine N ^{pro} und die virale Replikase NS3-5B, die von der authentischen BVDV-1 5'- und 3'NTR flankiert sind. Die Transkription unterliegt der Kontrolle eines T7-Promotor vor der 5'NTR (Isken et al., 2014)
pT7-DI-388 (5B/GAA)	Derivate des pT7-DI-388; trägt Mutationen im NS5B (GDD zu GAA) und ist dadurch replikationsinkompetent; diente als Negativkontrolle im Hinblick auf RNA-Replikation (Isken et al., 2014)
pT7-DI-388 (3/S163A)	Derivat des pT7-DI-388, welches aufgrund der Mutation S163A in der NS3 Proteasedomäne nicht mehr in der Lage ist das virale Polyprotein zu prozessieren; diente als Negativkontrolle (Isken et al., 2014)
pT7-DI-388 (3/V132A)	Derivat des pT7-DI-388; trägt die Mutation V132A in NS3 (Klemens et al., 2015)
pT7-DI-388 (4A/L45A)	Derivat des pT7-DI-388; trägt die Mutation L45A in NS4A; generiert mithilfe des <i>BlnI</i> - <i>SacI</i> Fragments aus pSK(-) NCP7 <i>SacI</i> - <i>SacI</i> (4A/L45A)
pT7-DI-388 (4A/Y47A)	Derivat des pT7-DI-388; trägt die Mutation L45A in NS4A; generiert mithilfe des <i>BlnI</i> - <i>SacI</i> Fragments aus pSK(-) NCP7 <i>SacI</i> - <i>SacI</i> (4A/Y47A)
pT7-DI-388 (4A/L45-Y47-AA)	Derivat des pT7-DI-388; trägt die Mutation L45A in NS4A; generiert mithilfe des <i>BlnI</i> - <i>SacI</i> Fragments aus pSK(-) NCP7 <i>SacI</i> - <i>SacI</i> (4A/L45-Y47-AA)
pBici RLuc IRES-Ubi-NS3-3'	Bicistronische BVDV-Reportergen-Replikon; basiert auf pBiCi RLuc NS3-3' (Isken et al., 2014), kodiert im ersten ORF BVDV-1

	N ^{pro} und <i>Renilla</i> -Luciferase; kodiert im zweiten ORF bovines Ubiquitin und die virale Replikase (NS3-5B); generiert mithilfe des <i>KpnI</i> - <i>AgeI</i> Fragments aus pCITE Ubi-NS3-4A ₍₁₋₄₉₎ -TEV-GST
pBici RLuc IRES-Ubi-NS3-3' (5B/GAA)	Derivat des pBici RLuc IRES-Ubi-NS3-3'; trägt Mutationen im NS5B (GDD zu GAA) und ist dadurch replikationsinkompetent; diente als Negativkontrolle im Hinblick auf RNA-Replikation
pBici RLuc IRES-Ubi-NS3-3' (3/V132A)	Derivat des pBici RLuc IRES-Ubi-NS3-3'; trägt die Mutation V132A in NS3; generiert mithilfe des <i>AgeI</i> - <i>BlnI</i> Fragments von pT7-DI-388 (3/V132A)
pBici RLuc IRES-Ubi-NS3-3' (4A/L45A)	Derivat des pBici RLuc IRES-Ubi-NS3-3'; trägt die Mutation L45A in NS4A; generiert mithilfe des <i>BlnI</i> - <i>SacI</i> Fragments aus pSK(-) NCP7 <i>SacI</i> - <i>Sall</i> (4A/L45A)
pBici RLuc IRES-Ubi-NS3-3' (4A/Y47A)	Derivat des pBici RLuc IRES-Ubi-NS3-3'; trägt die Mutation L45A in NS4A; generiert mithilfe des <i>BlnI</i> - <i>SacI</i> Fragments aus pSK(-) NCP7 <i>SacI</i> - <i>Sall</i> (4A/Y47A)
pBici RLuc IRES-Ubi-NS3-3' (4A/L45-Y47-AA)	Derivat des pBici RLuc IRES-Ubi-NS3-3'; trägt die Mutation L45A in NS4A; generiert mithilfe des <i>BlnI</i> - <i>SacI</i> Fragments aus pSK(-) NCP7 <i>SacI</i> - <i>Sall</i> (4A/L45-Y47-AA)

Tabelle 3.16 Liste der verwendeten BVDV-Gesamtklone (virale cDNAs)

Name	Beschreibung
pNCP7-388	Infektiöser cDNA Klon des BVDV-1 Stammes NCP7 (Corapi et al., 1988)
pNCP7-388 (5B/GAA)	Derivat des pNCP7-388; trägt Mutationen im NS5B (GDD zu GAA) und ist dadurch replikationsinkompetent; diente als Negativkontrolle im Hinblick auf RNA-Replikation
pNCP7 NS2-Ubi-NS3	Derivat des pNCP7-388; enthält den Ubiquitin-kodierenden Bereich des BVDV-1 Stammes Osloss zwischen den kodierenden Regionen von NS2 und NS3 (Aminosäureaustausch G76S); die NS2-Protease ist durch die Deletion von C376 (bzw. C1512 im Polyprotein) inaktiviert; entspricht pN7 2 ⁺ -Ubi*-3 (Klemens et al., 2015)
pNCP7 NS2-Ubi-NS3 (2/E440V)	Derivat des pNCP7 NS2-Ubi-NS3; trägt die Mutation E440V in NS2; entspricht pN7-2 ⁺ /EV-Ubi*-3 (Klemens et al., 2015)
pNCP7 NS2-Ubi-NS3 (2/E440V + 3/V132A)	Derivat des pNCP7 NS2-Ubi-NS3; trägt die Mutationen E440V in NS2 und V132A in NS3; entspricht pN7-2 ⁺ /EV-Ubi*-3/VA (Klemens et al., 2015)
pNCP7 NS2-Ubi-NS3 (2/E440V + 4A/L45A)	Derivat des pNCP7 NS2-Ubi-NS3 (2/E440V); trägt die Mutationen E440V in NS2 und L45A in NS4A; generiert mithilfe des <i>BlnI</i> - <i>SacI</i> Fragments aus pSK(-) NCP7 <i>SacI</i> - <i>Sall</i> (4A/L45A)
pNCP7 NS2-Ubi-NS3 (2/E440V + 4A/Y47A)	Derivat des pNCP7 NS2-Ubi-NS3 (2/E440V); trägt die Mutationen E440V in NS2 und Y47A in NS4A; generiert mithilfe des <i>BlnI</i> - <i>SacI</i> Fragments aus pSK(-) NCP7 <i>SacI</i> - <i>Sall</i> (4A/Y47A)
pNCP7 NS2-Ubi-NS3 (4A/L45A)	Derivat des pNCP7 NS2-Ubi-NS3; trägt die Mutation L45A in NS4A; generiert mithilfe des <i>BlnI</i> - <i>SacI</i> Fragments aus pSK(-) NCP7 <i>SacI</i> - <i>Sall</i> (4A/L45A)
pNCP7 NS2-Ubi-NS3 (4A/Y47A)	Derivat des pNCP7 NS2-Ubi-NS3; trägt die Mutation Y47A in NS4A; generiert mithilfe des <i>BlnI</i> - <i>SacI</i> Fragments aus pSK(-) NCP7 <i>SacI</i> - <i>Sall</i> (4A/Y47A)

pNCP7 NS2-IRES-NS3	Derivat des pNCP7; kodiert eine EMCV-IRES zwischen den kodierenden Regionen von NS2 und NS3; die NS2-Protease ist durch die Deletion von C376 (bzw. C1512 im Polyprotein) inaktiviert; entspricht pN7-2 ⁺ -EI-3 (Klemens et al., 2015)
pNCP7 NS2-IRES-NS3 (2/E440V)	Derivat des pNCP7 NS2-IRES-NS3; trägt die Mutation E440V in NS2; entspricht pN7-2 ⁺ /EV-EI-3 (Klemens et al., 2015)
pNCP7 NS2-IRES-NS3 (2/E440V + 3/V132A)	Derivat des pNCP7 NS2-IRES-NS3; trägt die Mutationen E440V in NS2 und V132A in NS3; entspricht pN7-2 ⁺ /EV-EI-3/VA (Klemens et al., 2015)
pNCP7 NS2-IRES-NS3 (2/E440V + 4A/L45A)	Derivat des pNCP7 NS2-IRES-NS3 (2/E440V); trägt die Mutationen E440V im NS2 und L45A im NS4A; generiert mithilfe des <i>BlnI-SalI</i> Fragments aus pSK(-) NCP7 <i>SacI-SalI</i> (4A/L45A)
pNCP7 NS2-IRES-NS3 (2/E440V + 4A/Y47A)	Derivat des pNCP7 NS2-IRES-NS3 (2/E440V); trägt die Mutationen E440V im NS2 und Y47A im NS4A; generiert mithilfe des <i>BlnI-SalI</i> Fragments aus pSK(-) NCP7 <i>SacI-SalI</i> (4A/Y47A)
pNCP7 NS2-IRES-Ubi-NS3	Derivat des pNCP7 NS2-IRES-NS3; kodiert N-terminal des NS3 für bovines Ubiquitin; generiert mithilfe des <i>KpnI-AgeI</i> Fragments aus pBici RLuc IRES-Ubi-NS3-3'
pNCP7 NS2-IRES-Ubi-NS3 (2/E440V)	Derivat des pNCP7 NS2-IRES-NS3 (2/E440V); trägt die Mutation E440V in NS2; generiert mithilfe des <i>KpnI-AgeI</i> Fragments aus pBici RLuc IRES-Ubi-NS3-3'
pNCP7 NS2-IRES-Ubi-NS3 (2/E440V + 3/V132A)	Derivat des pNCP7 NS2-IRES-NS3 (2/E440V + 3/V132A); trägt die Mutationen E440V in NS2 und V132A in NS3; generiert mithilfe des <i>KpnI-BlnI</i> Fragments aus pBici RLuc IRES-Ubi-NS3-3' (3/V132A)
pNCP7 NS2-IRES-Ubi-NS3 (2/E440V + 4A/L45A)	Derivat des pNCP7 NS2-IRES-Ubi-NS3 (2/E440V); trägt die Mutationen E440V in NS2 und L45A in NS4A; generiert mithilfe des <i>BlnI-SalI</i> Fragments aus pSK(-) NCP7 <i>SacI-SalI</i> (4A/L45A)
pNCP7 NS2-IRES-Ubi-NS3 (2/E440V + 4A/Y47A)	Derivat des pNCP7 NS2-IRES-Ubi-NS3 (2/E440V); trägt die Mutationen E440V in NS2 und Y47A in NS4A; generiert mithilfe des <i>BlnI-SalI</i> Fragments aus pSK(-) NCP7 <i>SacI-SalI</i> (4A/Y47A)

3.1.9 *E. coli* Stämme

Tabelle 3.17 Liste der verwendeten *E. coli* Stämme

Name	Beschreibung
HB101	<i>E. coli</i> Stamm für molekularbiologische Standardarbeiten; genutzt für Retransformationen von Plasmid-DNA und Klonierungen
DH5 α	<i>E. coli</i> Stamm für Klonierungen mittels pGEM-T; Stamm ermöglicht die Blau/Weiß-Selektion.

3.1.10 Eukaryontische Zelllinien

Tabelle 3.18 Liste der verwendeten eukaryontischen Zelllinien

Name	Beschreibung	Kulturmedium und Zusätze
MDBK	Madin Darby Bovine Kidney Zellen (American Type Culture Collection (ATCC), Rockville (Md), USA)	MEM (Gibco, Darmstadt) 10% (v/v) Pferdeserum 100.000 U/l Penicillin 0,1 g/l Streptomycin 1% nicht-essentielle Aminosäuren
SK-6	Swine Kidney Zellen (American Type Culture Collection (ATCC), Rockville (Md), USA)	MEM (Gibco, Darmstadt) 10% (v/v) FKS (PAA) 100.000 U/l Penicillin 0,1 g/l Streptomycin
Huh7-T7	Humane Hepatom Zelllinie; exprimiert stabil die T7-RNA-Polymerase; zur Verfügung gestellt von Dr. Stan Lemon (Chapel Hill, NC, USA) (Schultz et al., 1996)	DMEM (Gibco, Darmstadt) 10% (v/v) FKS 100.000 U/l Penicillin 0,1 g/l Streptomycin 125 µg/ml G418

3.1.11 Verwendete Viren

Tabelle 3.19 Liste der verwendeten Viren

Name	Beschreibung
BVDV-1 NCP7	Nicht-zytopathogener BVDV-1 Stamm NCP7 CP7 (Meyers et al., 1996; Pankraz et al., 2005)
BVDV-1 CP7	Zytopathogener BVDV-1 Stamm CP7 (Meyers et al., 1996; Pankraz et al., 2005; Tautz et al., 1996)
MVA-T7 ^{pol}	Rekombinantes modifiziertes Vaccinia-Virus-Ankara (MVA)-T7 ^{pol} zur Verfügung gestellt von G. Sutter (LMU, München) (Sutter et al., 1995)

3.1.12 Puffer und Lösungen

Tabelle 3.20 Liste der verwendeten Puffer und Lösungen entsprechend des Verwendungszwecks

Verwendungszweck	Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Agarosegel-Elektrophorese	DNA-Probenpuffer (5x)	0,1 % (w/v) Orange-G; 30 % (v/v) Glycerin
	RNA-Formamid Auftragspuffer (2x)	95 % Formamid; 0,025 % Xylen Cyanol; 0,025 % Bromphenolblau; 18 mM EDTA; 0,025 % SDS
	TAE-Puffer	2 % (v/v) modifiziertes TAE-Puffer-Konzentrat (50x Modified Tris-Acetate EDTA buffer, Millipore)
Bakterienkultur	LB-Medium (Luria/Miller)	10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl pH 7,0
	X-Gal zur Blau/Weiß Selektion	40 mg/ml X-Gal in Dimethylformamid
Immunfluoreszenz	DAPI-Lösung	2 mg/ml DAPI in ddH ₂ O
	N-Octyl-Glycopyranosid	0,5 % N-Octyl-β-D-Glycopyranosid
	PBS ⁺⁺	100 ml PBS ⁺⁺ in 1x PBS

	PBS ⁺⁺ (10x)	0,49 mM MgCl ₂ ; 0,68 mM CaCl ₂ in PBS
Plasmid-DNA Präparation	P1/S1	50 mM Tris/HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 mg/l RNase A
	P2/S2	200 mM NaOH; 1 % (w/v) SDS
	P3/S3	2,3 M Kaliumacetat pH 5,1 mit HCl
Plasmid-DNA Präparation (Midi-Kulturen)	N2	100 mM Tris; 15 % Ethanol; 900 mM KCl; 0,15 % Triton X-100; eingestellt auf pH 6,3 mit H ₃ PO ₄
	N3	100 mM Tris; 15 % Ethanol; 1 M KCl; eingestellt auf pH 8,5 mit H ₃ PO ₄
	N5	100 mM Tris; 15 % Ethanol; 1 M KCl; eingestellt auf pH 8,5 mit H ₃ PO ₄
PCR	dNTP-Lösung	10 mM; jeweils 2,5 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP
Primer-Hybridisierung	Hybridisierungspuffer (2x)	10mM Tris, 50 mM NaCl, 1mM EDTA, pH 7.5-8.0
Radioimmunpräzipitation	RIPA (G)	150 mM NaCl; 1 % NP40; 0,5 % Desoxycholat; 0,1 % SDS; 50 mM Tris (pH 8,0); 1 mM Pefabloc-SC
	Fixierlösung	40 % Methanol; 10 % Essigsäure
SDS-PAGE	Anodenpuffer	2 M Tris, pH 8,9 mit HCl
	Kathodenpuffer	1 M Tris; 1 M Tricin; 1 % SDS; pH 8,25 mit HCl
	Gelpuffer (Jagow)	3 M Tris; 0,3 % SDS; pH 8,45 mit HCl
	SDS-Probenpuffer (4x)	0,25 M Tris, pH 6,8; 6 % SDS; 40 % Glycerol; 0,05 % Bromphenolblau; 20 % 2-Mercaptoethanol
	Transferpuffer	48 mM Tris; 39 mM Glycin; 20 % Methanol
Western Blot	Blockierlösung	5 % Magermilchpulver in PBS-Tween (0,05 % (v/v))
	PBS-Tween	0,05 % Tween in PBS
Zellkultur	PBS	137 mM NaCl; 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ ; 2,7 mM KCl; 1,47 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4 mit HCl
	Trypsin/EDTA (10x)	0,5 % Trypsin, 0,2 % EDTA

3.2 Methoden

3.2.1 Arbeiten mit DNA

Ein Teil der in dieser Arbeit hergestellten DNA-Konstrukte wurden in Zusammenarbeit mit den Technischen Assistentinnen Martina Alexander und Stefanie Schwindt hergestellt. Einige der verwendeten Konstrukte waren bereits in den Vorarbeiten von Oliver Klemens hergestellt worden.

3.2.1.1 Transformation von Bakterien mittels Hitze-Schock

Das Einbringen von Plasmid-DNA in kompetente *E. coli* HB101 bzw. *E. coli* DH5 α wurde mithilfe der Hitze-Schock-Transformation durchgeführt. Für die Retransformation bereits vorhandener Plasmid-DNA wurden 20 μ l kompetente *E. coli* HB101 mit 50-100 ng Plasmid-DNA versetzt. DNA-Ligationen (siehe 3.2.1.7) und QuikChange-PCR Reaktionen (siehe 3.2.1.11) wurden zu 50 μ l kompetenten *E. coli* HB101 hinzugegeben. Die Transformation von pGEM[®]-T Klonierungen (siehe 3.2.1.10) erfolgte mit 50 μ l kompetenten *E. coli* DH5 α . Die Mischung aus DNA und kompetenten Bakterien wurde für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation für 2 min bei 42 °C. Danach wurde die Bakteriensuspension für 2 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 200 μ l LB-Medium ohne Antibiotikum und die Inkubation für 30-60 min bei 37°C und 800 rpm. Die Bakteriensuspension wurde anschließend auf eine LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum (100 mg/ml Ampicillin bzw. 30 mg/ml Kanamycin) ausgestrichen. Bei der Retransformation bereits vorhandener Plasmid-DNA wurden hierbei 50 μ l der Bakteriensuspension ausplattiert. Bei Transformationen von DNA-Ligationen, QuikChange-PCR Reaktionen und pGEM[®]-T Klonierungen wurde der gesamte Ansatz ausgestrichen.

3.2.1.2 Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkultur (2-3 ml) erfolgte standardmäßig mittels alkalischer Lyse der Bakterien, gefolgt von der Präzipitation der DNA (Birnboim and Doly, 1979). Dafür wurde am Vortag eine Einzelkolonie von antibiotikaresistenten Bakterien in Antibiotikum-haltiges LB-Medium (Ampicillin: 100 μ g/ml, Kanamycin: 30 μ g/ml) inokuliert und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert wurde. Am nächsten Tag wurden die Bakterien pelletiert (1 min, 16.000 x g, RT) und in 200 μ l Puffer 1 (P1) resuspendiert. Anschließend erfolgte die alkalische Lyse durch die Zugabe von Puffer 2 (P2) für 5 min bei RT. Durch die Zugabe von 200 μ l eiskaltem Puffer 3 (P3) wurde die Reaktion gestoppt bzw. neutralisiert und es erfolgte die Inkubation für 10 min auf Eis. Das Mischen der jeweiligen Puffer erfolgte durch 3-5-maliges Invertieren. Im Anschluss wurde das Lysat zentrifugiert (10 min, 16.000 x g, 4°C). Der klare Überstand wurde zu 600 μ l Isopropanol gegeben und die Plasmid-DNA durch Zentrifugation präzipitiert (30 min, 16.000 x g, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen, das DNA-Pellet mit 200 μ l Ethanol (70% (v/v)) gewaschen und es wurde erneut zentrifugiert (5 min, 16.000 x g,

RT). Der klare Überstand wurde abgenommen und die Plasmid-DNA getrocknet (10 min, 37°C). Abschließend wurde die Plasmid-DNA, je nach erwarteter Ausbeute, in 30-50 µl ddH₂O (Roth) gelöst.

3.2.1.3 Midi-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Präparation von Plasmid-DNA im größeren Maßstab wurde mithilfe von Anionen-Austauscher-Säulen Nucleobond® AX 100 nach den Angaben des Herstellers (Macherey-Nagel, Düren) durchgeführt. Dafür wurden Bakterienkulturen mit einem Volumen von 50-100 ml (Plasmide mit hoher Plasmidkopienzahl) bzw. 200 ml (Plasmide mit niedriger Plasmidkopienzahl – BVDV Gesamtklone) aufgearbeitet. Am Vortag wurde eine Kolonie der entsprechenden Bakterienkultur in Antibiotikumhaltiges LB-Medium (Ampicillin: 100 µg/ml, Kanamycin: 30 µg/ml) inokuliert und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterien pelletiert (10 min, 4.500 x g, 4°C) und in 5 ml eiskaltem S1-Puffer (8 ml bei 200 ml Bakterienkultur) resuspendiert. Danach erfolgte die Lyse der Bakterien durch die Zugabe von 5 ml S2-Puffer (8 ml bei 200 ml Bakterienkultur) für 5 min bei RT. Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von 5 ml eiskaltem S3-Puffer (8 ml bei 200 ml Bakterienkultur) neutralisiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Das Bakterienlysat wurde daraufhin mittels der im Kit enthaltenen Papierfilter vorgeklärt und anschließend auf eine AX 100-Säule gegeben, die zuvor mit 2,5 ml N2-Puffer equilibriert wurde. Nachdem das Lysat komplett durch die Säule gelaufen war, erfolgte ein Waschschriff mit 10 ml N3-Puffer. Die an der Säule gebundene Plasmid-DNA wurde anschließend mit 3 ml N5-Puffer eluiert. Daraufhin wurde die Plasmid-DNA durch die Zugabe von 3 ml Isopropanol gefällt und zentrifugiert (30 min, 16.000 x g, 4°C). Das DNA-Pellet wurde mit 500 µl Ethanol (70% (v/v)) gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min, 16.000 x g, RT). Der klare Überstand wurde abgenommen und die Plasmid-DNA getrocknet (10 min, 37°C). Daraufhin wurde die Plasmid-DNA in 100 µl ddH₂O (Roth) gelöst.

3.2.1.4 DNA-Restriktionsanalysen (analytisch-, präparativ-, Linearisierung)

Restriktionsanalysen wurden zur Verifizierung bereits vorhandener Plasmid-DNA (analytische Restriktionsanalyse), zur Generierung neuer DNA-Konstrukte (präparative Restriktionsanalyse für Klonierungen) und zur Linearisierungen von Plasmid-DNA, in Vorbereitung auf die *in vitro* Transkription (siehe auch 3.2.2.1), durchgeführt. Standardmäßig wurden die Restriktionsendonukleasen der Firma NEB (New England Biolabs, Frankfurt/Main) nach den Angaben des Herstellers und mit den erhältlichen Puffern verwendet. Die Restriktionsansätze für den analytischen- bzw. präparativen Zweck und zur Linearisierung wurden wie in Tabelle 3.21 beschrieben pipettiert.

Tabelle 3.21 Restriktionsanalyseansätze von Plasmid-DNA aus Mini- bzw. Midi-Präparation sortiert nach ihrem Verwendungszweck (analytisch, präparativ, Linearisierung)

Inhalt	analytisch	analytisch	präparativ	Linearisierung ^B
DNA aus	Mini-Präparation	Midi-Präparation	Midi-Präp	Midi-Präp
10x Puffer	2 µl	2 µl	3 µl	20 µl
Restriktionsenzym ^A	0,3 µl	0,3 µl	0,5-1,0 µl	3,0 µl (<i>Sma</i> I)
DNA	2-5 µl	0,5-1,0 µg	1,0-2,0 µg	5-10 µg
ddH ₂ O	ad 20 µl	ad 20 µl	ad 30 µl	ad 200 µl

^A: von High-Fidelity (HF)-Enzymen wurden 0,1-0,3 µl für analytische Restriktionsansätze eingesetzt

Analytische Restriktionen erfolgten i.d.R. für 45-60 min, wohingegen präparative Restriktionen für 1,5-2,5 h durchgeführt wurden. Standardmäßig wurde der Restriktionsansatz bei 37°C inkubiert. Enzyme mit abweichender Optimal-Temperatur wurden entsprechend den Herstellerangaben inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Ansätze mit 5x DNA-Probenpuffer versetzt und mittels Agarose Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe 3.2.1.5). Linearisierungen erfolgten mit dem Restriktionsenzym *Sma*I bei 25°C für 2-3 h und wurden nach den Angaben in 3.2.1.8 (Phenol/Chlorform-Extraktion und Ethanolfällung) bzw. 3.2.2.1 (*in vitro* Transkription) weiter prozessiert.

3.2.1.5 Agarosegel-Elektrophorese und Isolation von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten aus analytischen- und präparativen Restriktionsanalysen sowie Linearisierungen (siehe 3.2.1.4), von PCR-Produkten (siehe 3.2.1.9) und von RNA aus *in vitro* Transkriptionen (siehe 3.2.2.1) erfolgte mittels Agarosegel-Elektrophorese. Je nach den erwarteten Fragmentgrößen wurden Gele mit 0,8-1,5% (w/v) Agarose in 1 x TAE-Puffer (50x Modifizierter Tris-Acetate EDTA Puffer, Millipore) verwendet, die mit 10 µl/l Midori Green Advance (Nippon Genetics Europe, Düren) versetzt wurden. Durch Aufkochen wurde die Agarose in 1x TAE-Puffer gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei 55°C im Wasserbad gelagert. Je nach Probenanzahl und Verwendungszweck wurden entsprechende Agarosegele mit der entsprechenden Anzahl an Beladungstaschen hergestellt.

Vor dem Auftrag wurden die DNA-Proben mit DNA-Probenpuffer (5x) versetzt, RNA-Proben wurden mit RNA-Formamid Auftragspuffer (2x) versetzt. Parallel zu den Proben wurde GeneRuler™ 1 kb Plus DNA-Leiter (Thermo Scientific) als Größenstandard mitgeführt. DNA-Proben wurden je nach den erwarteten Fragmentgrößen für 20-25 min bei 120 V aufgetrennt. RNA-Proben aus *in vitro* Transkriptionen wurden für 10 min aufgetrennt. Die Gele wurden im UV-Durchlicht (254 nm Wellenlänge) analysiert und anschließend dokumentiert. DNA-Fragmente, die für Klonierungen genutzt werden sollten, wurden mittels UV-Durchlicht bei einer Wellenlänge von 312 nm sichtbar gemacht, um die Beeinträchtigung der DNA durch das UV-Licht so gering wie möglich zu halten.

Für die Isolation von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel wurde der entsprechende Bereich mit dem Skalpell aus dem Gel geschnitten. Um DNA-Schäden zu vermeiden wurde darauf geachtet, dass die UV-Exposition und die Belichtungszeit so gering wie möglich ist und diese schrittweise stattfand. Das Agarosegelstück wurde anschließend auf eine Säule des Kits „Montage DNA Gel Extraction Kit“ (Merck Millipore, Hilden) gegeben und bei 5000 x g für 10 min zentrifugiert. Die eluierte DNA-Lösung wurde anschließend für DNA-Ligationen verwendet.

3.2.1.6 Primer-Hybridisierung

Die DNA-Primer eines Primerpaares (Sigma-Aldrich, Taufenkirchen) wurden zunächst jeweils in ddH₂O gelöst (100 µM). 10 µl jeder Primerlösung wurden zusammengegeben und mit 20 µl Hybridisierungspuffer (2 x) versetzt. Anschließend erfolgte die Inkubation für 5 min bei 95°C auf dem Heizblock. Daraufhin wurde die Lösung langsam auf RT abgekühlt (ca. 5°C/min). Das hybridisierte Primerpaar wurde danach mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt, aus dem Agarosegel isoliert (siehe 3.2.1.5) und es erfolgte die Restriktion mit den entsprechenden Enzymen (siehe 3.2.1.4) und die DNA-Ligation (siehe 3.2.1.7).

3.2.1.7 DNA-Ligation

Zur Generierung von neuen DNA-Plasmiden wurden zuvor gereinigten DNA-Fragmente (siehe 3.2.1.5) mithilfe der T4 DNA-Ligase (New England Biolabs, Frankfurt/Main) und dem mitgelieferten 10x T4 Ligase-Puffer durchgeführt. Bei einer DNA-Ligation wurde zwischen Vektor- bzw. Insertfragmenten unterschieden, wobei erstere i.d.R. das Antibiotika-Resistenzgen enthielten. Die Standard-Ligationsreaktion von einem Vektor- mit einem Insertfragment (2-Fragmentligation) setzte sich aus 3 µl DNA-Lösung des Vektorfragments, 14 µl DNA-Lösung des Insertfragments, 2 µl 10x T4 Ligase-Puffer und 1 µl T4 DNA-Ligase zusammen. Der Ansatz wurde standardmäßig für 1 h bei 16°C inkubiert. Für den Fall, dass eine Ligation ineffizient war, wurde die Inkubation bei 4°C über Nacht durchgeführt. Im Anschluss an die Ligationsreaktion erfolgte die Transformation des gesamten Ansatzes in 50 µl *E. coli* HB101 mittels Hitze-Schock und das Ausstreichen des gesamten Transformationsansatzes auf eine entsprechende LB-Agarplatte mit Antibiotikum (siehe 3.2.1.1). Die Plasmid-DNA der entstandenen Kolonien wurde isoliert (siehe 3.2.1.2) und mittels DNA-Restriktion (siehe 3.2.1.4) und Sequenzierung (siehe 3.2.1.12) auf die erfolgreiche Klonierung getestet.

3.2.1.8 Phenol-/Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung von linearisierter Plasmid-DNA

In Vorbereitung auf die *in vitro* Transkription von RNA (siehe 3.2.2.1) wurde das linearisierte DNA-Template (10 µg) (siehe 3.2.1.4) mittels Phenol-/Chloroform-Extraktion und anschließender Ethanol-fällung gereinigt, um das im Restriktionsansatz enthaltene Restriktionsenzym und die Pufferkomponenten zu entfernen. Zur Qualitätskontrolle wurden zuvor 2 µl des

Linearisierungsansatzes entnommen und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Zum Rest des Linearisierungsansatzes wurde im ersten Reinigungsschritt 200 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Roth, Karlsruhe) hinzugegeben, für 15 s auf dem Vortex gemischt und anschließend zentrifugiert (3 min, 16.000 x g, RT). Der wässrige Überstand wurde abgenommen und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert, in das 200 µl Trichlormethan/Chloroform (Roth, Karlsruhe) vorgelegt wurde. Der Ansatz wurde für 15 s auf dem Vortex gemischt und anschließend zentrifugiert (3 min, 16.000 x g, RT). Im Anschluss daran wurde die wässrige Phase abgenommen und in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Daraufhin wurde die darin enthaltene DNA durch die Zugabe von 10 % (v/v) 3 M Natriumacetat und zwei Volumen Ethanol (100 %) bei -80°C für mind. 2 h (oder über Nacht) gefällt und anschließend zentrifugiert (30 min, 16.000 x g, 4°C). Die pelletierte DNA wurde mit 200 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, zentrifugiert (5 min, 16.000 x g, 4°C) und in 55 µl RNase-freien ddH₂O (Roth, Karlsruhe) gelöst. Zur Qualitätskontrolle wurden 2 µl dieser DNA-Lösung entnommen und parallel zur linearisierten DNA, die nicht aufgereinigt wurde, mittels Agarosegel-Elektrophorese analysiert (siehe 3.2.1.5). Die gereinigte linearisierte DNA konnte im Folgenden zur *in vitro* Transkription von RNA genutzt werden (siehe 3.2.2.1).

3.2.1.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA-Abschnitten für Klonierungszwecke wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Hierfür wurden zunächst die entsprechenden PCR-Primerpaare (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) mit der Software „Serial Cloner 2.6.1“ (Open Source: http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html) oder „Vector NTI Advance“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), USA) designed (Schmelztemperatur i.d.R. bei 55°C). Der Ansatz einer Standard-PCR bestehend aus 10x *Taq*-Puffer (NatuTec, Frankfurt/Main), den PCR-Primern (Sigma-Aldrich, Taufkirchen), dNTP-Mix (Invitrogen, Darmstadt), dem jeweilige DNA-Template, der *Taq* DNA-Polymerase (NatuTec, Frankfurt/Main) und ddH₂O (Roth, Karlsruhe) wurde wie in Tabelle 3.22 beschrieben pipettiert und nach den Angaben in Tabelle 3.23 im Thermocycler (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) inkubiert.

Tabelle 3.22 Ansatz für eine Standard-PCR

Volumen	Inhalt
5 µl	10x <i>Taq</i> -Puffer
1 µl	Primer 1 (10 mM)
1 µl	Primer 2 (10 mM)
1 µl	dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; jeweils 10 mM)
1 µl	DNA-Template (100 ng/ µl)
1 µl	<i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/µl)
40 µl	ddH ₂ O

Tabelle 3.23 Programm für eine Standard-PCR

Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
94°C	2 min	1
94°C	45 s	} 25
55°C	45 s	
72°C	1 min/kb	} 1
72°C	10 min	
16°C	∞	1

3.2.1.10 pGEM[®]-T Klonierung

Die Klonierung von PCR-Fragmenten erfolgte mit dem „pGEM[®]-T Vektor System I“ (Promega, Madison (MI), USA). Im ersten Schritt wurden die generierten PCR-Fragmente mittels Agarosegel-Elektrophorese aufgereinigt (siehe 3.2.1.5). 5 µl des Ligations-Puffers (2x) wurden mit 3 µl der aufgearbeiteten DNA-Lösung des PCR-Fragments, 1 µl pGEM[®]-T Vektor (54 ng/µl) und 1 µl T4 DNA-Ligase (35 U) zusammengegeben. Die Ligation erfolgte für 1 h bei 16 °C. Danach schloss sich die Transformation des gesamten Ligationsansatzes in 50 µl *E. coli* DH5α an (siehe 3.2.1.1). Die Verwendung des pGEM[®]-T Vektorsystems ermöglicht die β-Galaktosidase-vermittelte Blau-Weiß-Selektion. Nach der Transformation wurden deshalb 200 µl LB-Medium ohne Antibiotikum und 20 µl einer 4 %-igen (w/v) X-Gal-Lösung zu den Bakterien gegeben. Anschließend wurden die Bakterien für 30-60 min bei 37°C schüttelnd inkubiert und daraufhin auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert. Die Plasmid-DNA der weißen Einzelkolonien wurde im Folgenden isoliert und mittels Restriktion (siehe 3.2.1.4) und Sequenzierung (siehe 3.2.1.12) auf das entsprechende PCR-Produkt untersucht.

3.2.1.11 Gerichtete Mutagenese (QuikChange-PCR[™])

Die gerichtete Mutagenese oder QuikChange-PCR[™] (Stratagene, Heidelberg) wurde für die Generierung von Punktmutationen oder Restriktionssites in einem entsprechenden DNA-Template genutzt. Dafür wurde zunächst ein Primerpaar nach den Vorgaben des Herstellers generiert und eine PCR-Reaktion mit dem entsprechenden DNA-Template durchgeführt. In den PCR-Ansatz wurden 10x *Pfu*-Polymerase Puffer mit MgSO₄ (Thermo Fisher Scientific, Schwerte), die komplementären PCR-Primer (Sigma-Aldrich, Taufenkirchen), dNTP-Mix (Invitrogen, Darmstadt), das jeweilige DNA-Template, *Pfu*-Polymerase und ddH₂O (Roth, Karlsruhe) wie in Tabelle 3.24 beschrieben gegeben und nach den Angaben in Tabelle 3.25 im Thermocycler (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) inkubiert.

Tabelle 3.24 PCR-Ansatz für die gerichtete Mutagenese (QuikChange-PCR[™])

Volumen	Inhalt
5 µl	10x Puffer
1 µl	Primer 1 (16 mM)
1 µl	Primer 2 (16 mM)
1 µl	dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; jeweils 10 mM)
1 µl	DNA-Template (100 ng/ µl)
1 µl	<i>Pfu</i> DNA-Polymerase (5 U/µl)
40 µl	ddH ₂ O

Tabelle 3.25 PCR-Programm für die gerichtete Mutagenese (QuikChange-PCR[™])

Temperatur	Zeit	Zykluszahl
94°C	2 min	1
94°C	45 s	} 20
50°C	45 s	
68°C	2 min/kb	
68°C	10 min	1
16°C	∞	1

Im Anschluss an die PCR-Reaktion wurden 5 µl des Ansatzes für analytische Zwecke entnommen und mit DNA-Probenpuffer versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert (-*DpnI*). Um das DNA-Template zu zerstören wurde zu dem restlichen PCR-Ansatz 1 µl *DpnI* (NEB, Frankfurt/Main)

pipettiert und es erfolgte ein Inkubationsschritt für 30-60 min bei 37°C. Da *DpnI* nur methylierte DNA schneidet, bleibt das PCR-Produkt von dieser Restriktion unbeeinträchtigt. Danach wurden 5 µl des Ansatzes entnommen, mit DNA-Probenpuffer versetzt und parallel mit dem Ansatz ohne *DpnI* mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Maximal 3 µl des PCR-Ansatzes (+*DpnI*) wurden in *E. coli* HB101 transformiert (siehe 3.2.1.1). Der PCR-Ansatz ohne *DpnI* diente als Negativkontrolle. In den Bakterien werden die bis dahin nicht verknüpften 5'-Enden der neusynthetisierten DNA (auch 5'-Nick genannt) durch bakterieneigene Ligationsmechanismen miteinander verbunden („repariert“), wodurch ein vollständiges doppelsträngiges DNA-Plasmid entsteht, das vom Bakterium amplifiziert werden kann. Die Plasmid-DNA der entstandenen Kolonien wurde isoliert (siehe 3.2.1.2) und mittels DNA-Restriktion (siehe 3.2.1.4) und Sequenzierung (siehe 3.2.1.12) auf die erfolgreiche Mutagenese hin untersucht.

3.2.1.12 Sequenzierungen

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA aus Midi-Präparationen erfolgte durch die Firma LGC-Genomics GmbH (Berlin). Für eine Standardsequenzierung (Ready/Flexi Run) wurden 0,8-1,0 µg Plasmid-DNA mit 4 µl des entsprechenden Sequenzierprimers (10 µM) zusammengegeben und auf 14 µl mit ddH₂O aufgefüllt. Die Auswertung der Sequenzierungen erfolgte i.d.R. mit der Software „BioEdit“ (Tom Hall, <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>), Serial Cloner 2.6.1“ (Open Source: http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html) oder „Vector NTI Advance“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), USA).

3.2.2 Arbeiten mit RNA

3.2.2.1 In vitro Transkription

Die *in vitro* Transkription von RNA erfolgte mithilfe des „MAXIscript™ T7-Kits“ und des „MAXIscript™ SP6-Kits“ nach den Angaben des Herstellers (Ambion, Austin (TX), USA). Vorbereitend auf die *in vitro* Transkription wurden 10 µg des entsprechende DNA-Templates linearisiert (siehe 3.2.1.4) und mittels Phenol-/Chloroform-Extraktion gereinigt (siehe 3.2.1.8). Die daraus resultierende DNA-Lösung (ca. 200 ng/µl linearisiert Plasmid-DNA in RNase-freiem Wasser) wurde für die *in vitro* Transkription verwendet. Die *in vitro* Transkription der RNA des BVDV-Replikons T7-DI-388 erfolgte mittels T7-Polymerase, die Transkription der RNA des bicistronischen BVDV-Replikons Bici RLuc IRES-Ubi-NS3-3', sowie aller BVDV-Gesamtklone erfolgte mittels SP6-Polymerase. Ein Standard-Transkriptionsansatz mit einem Volumen von 20 µl setzte sich i.d.R. aus 12 µl DNA-Lösung, 4 µl rNTP-Mix (ATP, GTP, CTP und UTP, jeweils 10 mM), 2 µl 10x Transkriptionspuffer und 2 µl T7- bzw. SP6-Polymerase zusammen. Für den Fall, dass von bestimmten Transkripten eine größere Menge benötigt wurde (Wildtyp- oder Negativkontrollen), wurden auch 40 µl Ansätze pipettiert, wobei diese i.d.R. aus 25 µl DNA-Lösung, 8 µl rNTP-Mix (ATP,

GTP, CTP und UTP, jeweils 10 mM), 4 µl 10x Transkriptionspuffer und 3 µl T7- bzw. SP6-Polymerase zusammengesetzt waren. Nachdem der Transkriptionsansatz pipettiert war erfolgte die Inkubation für 1,5 bis 2 h bei 37°C. Anschließend wurde der Ansatz mit 1 µl TURBO DNase versetzt und für 10 min bei 37°C inkubiert, um die DNA-Matrize vollständig zu degradieren. Zur Qualitätskontrolle wurden 1-2 µl der RNA-Lösung mittels Agarosegel-Elektrophorese (siehe 3.2.1.5) analysiert. Mithilfe dieser Analyse wurde außerdem die Menge an RNA abgeschätzt, die für die Elektroporation eingesetzt werden musste (siehe 3.2.3.5). Bis zur weiteren Verwendung wurde die transkribierte RNA bei -80°C gelagert.

3.2.3 Arbeiten mit Zellen

3.2.3.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

Alle Zellkulturarbeiten wurden an sterilen Werkbänken (MSC-Advantage, Thermo Scientific; BSC-EN, Zapf) durchgeführt. Die Standard-Kulturbedingungen für humane- und bovine Zellen waren 37°C, 5 % CO₂ und 96% relative Luftfeuchte im Brutschrank (Labotect Incubator (C200, C42), Labotect, Göttingen). Die fortlaufende Kultivierung zur Erhaltung der Zellkultur wurde in 10 cm Schalen (CellStar®, Greiner Bio-One, Frickenhausen) durchgeführt. Je nach dem durchgeführten Experiment, wurden die Zellen zuvor in das entsprechende 6-, 12-, 24-, 48-, oder 96-Well Format ausgesät (CellStar®, Greiner Bio-One, Frickenhausen).

MDBK-Zellen (American Type Culture Collection (ATCC), Rockville (Md), USA) wurden standardmäßig in Minimum Essential Medium (MEM, Life Technologies (Gibco), Darmstadt) kultiviert, welches mit 10 % (v/v) Pferdeserum, 100.000 U/l Penicillin, 0,1 g/l Streptomycin und 1 % (v/v) nicht-essentiellen Aminosäuren versetzt war.

SK6-Zellen (American Type Culture Collection (ATCC), Rockville (Md), USA) wurden standardmäßig in Minimum Essential Medium (MEM, Life Technologies (Gibco), Darmstadt) kultiviert, welches mit 10 % (v/v) Fötalem Kälberserum (FKS), 100.000 U/l Penicillin, und 0,1 g/l Streptomycin versetzt war.

Huh7-T7-Zellen (zur Verfügung gestellt von Dr. Stan Lemon (Chapel Hill, NC, USA) (Schultz et al., 1996)) wurden standardmäßig in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Life Technologies (Gibco), Darmstadt) kultiviert, welches mit 10 % (v/v) Fötalem Kälberserum (FKS), 100.000 U/l Penicillin, 0,1 g/l Streptomycin und 125 µg/ml G418 (PAA, Cölbe) versetzt war.

Der Begriff „Vollmedium“ bezieht sich auf das jeweilige Kulturmedium, in dem alle Zusätze (siehe oben) enthalten waren. Im Gegensatz dazu enthielt Kulturmedium „ohne alles“ keinen der aufgeführten Zusätze. Das Waschen von Zellen erfolgte i.d.R. mit 1 ml 1 x PBS (im Folgenden nur als PBS bezeichnet). Die Ernte von Zellen erfolgte standardmäßig mittels Zellschaber (TPP, Trasadingen, Schweiz) in 1 ml

PBS, woraufhin die Zellen pelletiert wurden (1 min, 5,000 x g, RT). Die Zellpellets wurden vorübergehend bei -80°C gelagert, falls sie nicht sofort verwendet wurden.

3.2.3.2 T7-Vaccinia-Expression in eukaryontischen Zellen

Die Genexpression und daraus resultierende Proteinproduktion in eukaryontischen Zellen wurde T7-Polymerase (T7^{pol})-vermittelt durchgeführt (auch Vaccinia-Experiment genannt). Im ersten Schritt wurden hierfür die jeweiligen Zellen mit dem rekombinanten Vaccinia-Virus Modified-Vaccinia-Ankara-Virus (MVA) infiziert, welches für die T7-Polymerase kodiert (MVA-T7^{pol}) (Sutter et al., 1995). Danach erfolgte die Transfektion von Plasmid-DNA, wobei die RNA-Transkription dieser Konstrukte über einen T7-Promotor reguliert war. Standardmäßig wurde dieses Experiment in Huh7-T7-Zellen durchgeführt (Huh7-T7/MVA-T7^{pol}-System), die bereits stabil T7-Polymerase exprimieren (Schultz et al., 1996). Für den *Trans*-Komplementationsassay (siehe 3.2.3.11) wurde die MVA-T7^{pol}-vermittelte Genexpression in SK6-Zellen durchgeführt.

1/12 einer konfluent bewachsenen 10 cm Schale Huh7-T7-Zellen (ca. 2×10^5 Zellen) bzw. die SK6-Zellen einer Elektroporation (siehe 3.2.3.5) wurden pro Vertiefung einer 6-Well-Platte ausgesät. 4-6 h danach wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml DMEM (ohne alles) überschichtet, welches 5 µl Vaccinia-Virus MVA-T7^{pol}-Virusstocklösung enthielt (entspricht ca. MOI 2). 1 h nach der Infektion wurde die Infektionslösung von den Zellen pipettiert und einmal mit 1 ml PBS gewaschen, woraufhin die Zellen mit 1 ml DMEM (Vollmedium) überschichtet wurden. Anschließend erfolgte die DNA-Transfektion von 6 µg Plasmid-DNA, welche je nach Verwendungszweck mit Polyethylenimin (PEI MAX 40,000, Polysciences, Hirschberg an der Bergstrasse) oder mit Metafectene® (Biontex, München) durchgeführt wurde (siehe 3.2.3.3). Daraufhin wurden die Zellen über Nacht bei 37°C inkubiert. Sollte das Zelllysate nach den gebildeten Proteinen untersucht werden, wurde am nächsten Morgen zunächst der Überstand abgenommen und die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mithilfe eines Zellschabers in 1 ml PBS geerntet, pelletiert (1 min, 5.000 x g, RT) und in 120-160 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE (siehe 3.2.4.1) und Western Blot (siehe 3.2.4.2) analysiert.

3.2.3.3 DNA-Transfektion von Plasmid-DNA in eukaryontischen Zellen mittels Polyethylenimin (PEI) oder Metafectene®

Die Transfektion von Plasmid-DNA in eukaryontische Zellen erfolgte je nach Anwendung entweder mit dem Transfektionsreagenz Polyethylenimin (PEI MAX 40,000, Polysciences, Hirschberg an der Bergstrasse) oder mit Metafectene® (Biontex, München). Das Transfektionsreagenz PEI wurde für die Untersuchungen zur Aktivität der CSFV NS4A₃₇NS3 Protease und zur BVDV-Polyproteinprozessierung verwendet. Metafectene® wurde für den TEV-Protease (TEV^{pro})-Spaltungsassay (siehe 3.2.3.4) und den *Trans*-Komplementationsassay (siehe 3.2.3.11) genutzt.

Für die Transfektion mit PEI wurden 6 µg Plasmid-DNA mit Medium (ohne alles) in 100 µl vorgelegt. In ein separates Reaktionsgefäß wurden PEI (3 µl PEI/µg DNA) und Medium (ohne alles) gemischt zu einem finalen Volumen von 100 µl. Die DNA-Lösung und die PEI-Lösung wurden gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurde bei den zu transfizierenden Zellen das Medium abgenommen, einmal mit PBS gewaschen und 1 ml DMEM (Vollmedium) auf die Zellen gegeben. Im Anschluss an die 10-minütige Inkubationszeit wurde der Transfektionsmix vorsichtig auf die Zellen getropft. Da PEI einen toxischen Effekt auf Zellen hat wurde 2-4 h nach der Transfektion ein Wechseln des Mediums, wie oben beschrieben, vorgenommen. Anschließend wurden die Zellen für weitere 12-18 h bei 37°C inkubiert.

Für die Transfektion mit Metafectene® wurden 6 µg Plasmid-DNA in 80 µl Medium (ohne alles) vorgelegt. In ein separates Reaktionsgefäß wurden 10 µl Metafectene zu 70 µl Medium (ohne alles) gegeben. Die DNA-Lösung und die Metafectene®-Lösung wurden gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurde bei den zu transfizierenden Zellen das Medium abgenommen, einmal mit PBS gewaschen und 1 ml des jeweiligen Zellkulturmediums (Vollmedium) auf die Zellen gegeben. Im Anschluss an die 10-minütige Inkubationszeit wurde der Transfektionsmix vorsichtig auf die Zellen getropft. Anschließend wurden die Zellen für weitere 12-18 h bei 37°C inkubiert.

3.2.3.4 TEV-Protease (TEV^{pro}) Spaltungsassay

Für den TEV-Protease (TEV^{pro}) Spaltungsassay wurde eine T7-Vaccinia-Expression in Huh7-T7-Zellen vorgenommen (siehe 3.2.3.2). Nach der MVA-T7^{pol}-Infektion erfolgte die DNA-Kotransfektion von 4 µg pCITE Ubi-NS3-4A₍₁₋₄₉₎-TEV-GST (bzw. der Derivate) und 2 µg pGEM-T HA-TEV^{pro} (bzw. Kontrollplasmid pGEM-T leer) mit Metafectene®-Transfektionsreagenz (siehe 3.2.3.3). Nach der Transfektion wurden die Zellen für 12-18 h bei 37°C inkubiert. Die geernteten Zellen wurden in 160 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und die Lysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 3.2.4.1) und Western Blot analysiert (siehe 3.2.4.2). Als Sekundärantikörper diente in diesem Versuch anti-Maus IRDye 800CW, dessen Fluoreszenz mithilfe eines Odyssey SA infrared imaging systems (LI-COR®) detektiert und quantifiziert wurde. Die Western Blot Signale für NS4A₍₁₋₄₉₎-TEV-GST und GST wurden bestimmt und die NS4A₍₁₋₄₉₎-TEV-GST Spaltungsrate berechnet. Die entsprechenden Signale in der Mock-Probe wurden als „Hintergrund“ definiert und vor der Berechnung von den Signalen für NS4A₍₁₋₄₉₎-TEV-GST bzw. GST abgezogen.

3.2.3.5 Elektroporation von MDBK- und SK6-Zellen

Das Einbringen von *in vitro* transkribierter RNA in MDBK-Zellen oder SK6-Zellen erfolgte durch Elektroporation nach den Angaben in der Literatur (Tautz et al., 1999).

Am Vortag wurde eine konfluent bewachsene 10 cm Schale MDBK- bzw. SK6-Zellen im Verhältnis 1:2 in neue 10 cm Schalen umgesetzt (siehe 3.2.3.1). Am Folgetag wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, mittels Trypsin/EDTA (Sigma-Aldrich, Taufenkriehen) von der 10 cm Schale abgelöst, in 10 ml Vollmedium aufgenommen und in ein 50 ml Flacon überführt. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (2 min, 300 x g, RT) und zweimal mit 50 ml PBS (Lonza, Basel, Schweiz) gewaschen. Die Zellen einer 10 cm Schale wurden in 1,2 ml AccuGENE-PBS aufgenommen. Für eine Elektroporation wurden 400 µl der Zellsuspension in ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde 1 µg *in vitro* transkribierter RNA zu den Zellen gegeben, vorsichtig gemischt und die Suspension in eine Elektroporationsküvette mit 2 mm Elektrodenabstand gegeben. Die Elektroporation erfolgte in dem Elektroporationsgerät „GenePulser II Xcell“ (Biorad, München) bei einem elektrischen Impuls von 180 V und 950 µF. Im Anschluss wurden die Zellen mit 800 µl Medium aus der Küvette gespült und in ein Falcon mit entsprechender Menge an Medium gegeben. Danach wurden die Zellen ausgesät. Als Negativkontrolle (Mock) dienten Zellen, die ohne RNA elektroporiert wurden. Je nach experimentellem Ansatz wurden unterschiedliche Anteile der elektroporierten Zellen in die Vertiefungen einer 6-Well-Platte ausgesät. Grundsätzlich erfolgte das Aussäen in 2 ml des jeweiligen Zellkulturmediums.

Für die qualitativen Untersuchungen zur RNA-Replikation im Replikon- bzw. Gesamtklonkontext und bei Experimenten zur Virionmorphogenese nach Elektroporation (vom engl. *post electroporation*, pe), wurden die Zellen einer Elektroporation auf zwei Vertiefungen einer 6-Well-Platte ausgesät. Standardmäßig wurden die Zellen nach 24 h und 48 h pe mittels anti-NS3 Immunfluoreszenz untersucht (siehe 3.2.3.9). Je nach Experiment wurde vor Fixierung der Zellen der Zellkulturüberstand gesichert und für Infektionsexperimente (siehe 3.2.3.7) oder für die Bestimmung des Virustiters genutzt (siehe 3.2.3.8).

Für die quantitative Untersuchung der RNA-Replikation im Replikon mittels Luciferase-Assay (siehe 3.2.3.6) wurde die Hälfte einer konfluenten Schale MDBK-Zellen für eine Elektroporation nach den oben gemachten Angaben genutzt. Die elektroporierten Zellen wurden für diesen Zweck auf vier Vertiefungen einer 6-Well-Platte ausgesät.

Für den *Trans*-Komplementationsassay (siehe 3.2.3.11) wurden die SK6-Zellen entsprechend der oben gemachten Angaben elektroporiert und die Zellen einer Elektroporation auf eine Vertiefung einer 6-Well-Platte ausgesät.

3.2.3.6 Luciferase-Assay

MDBK-Zellen wurden mit 1 µg *in vitro* transkribierter Replikon-RNA nach den Angaben in 3.2.3.5 elektroporiert und ausgesät. An den Zeitpunkten 2 h, 24 h, 48 h und 72 h pe wurden die Zellen einmal mit 1 ml PBS gewaschen, mittels Zellschaber geerntet, zentrifugiert (2 min, 300 x g, RT) und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C gelagert.

Die Herstellung der Zelllysate und der Luciferase-Assay erfolgte mit dem Kit „*Renilla Glow Juice*“ (PJK, Kleinbittersdorf) nach den Angaben des Herstellers. Die pelletierten Zellen einer Probe in 40 µl des mitgelieferten Lysepuffers (mit Detergenz) auf dem Rüttler lysiert (10 min, 1.200 rpm, RT). Anschließend erfolgte die Messung von 20 µl des Lysats. Dafür wurden zunächst pro Messung 100 µl Reaktionspuffer und 2 µl Coelenterazin gemischt (beides im Kit enthalten). Direkt vor der Messung wurden 20 µl des Lysats zu 100 µl der Reaktionslösung (Reaktionspuffer + Coelenterazin) pipettiert und die Luciferase-Aktivität direkt danach am Luminometer (Junior LB9509, Berthold, Bad Wildbad) bestimmt.

3.2.3.7 Infektion von MDBK-Zellen

Der Nachweis von infektiösen Viren in Zellkulturüberständen erfolgte über die Neuinfektion von naiven MDBK-Zellen mit anschließender Immunfluoreszenzanalyse (siehe 3.2.3.9).

Für die Infektion zum qualitativen Nachweis von Viren im Zellkulturüberstand wurde 1/30 der MDBK-Zellen einer konfluenten 10 cm Schale auf eine Vertiefung einer 6-Well-Platte in 2 ml Medium ausgesät. 2-4 h nachdem sich die Zellen am Boden abgesetzt hatten, wurden 500 µl des Überstandes abgenommen und durch 500 µl des entsprechend zu untersuchenden Zellkulturüberstandes ersetzt. Anschließend wurden die Zellen für 72 h bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte der Nachweis von infizierten Zellen mittels anti-NS3 Immunfluoreszenzanalyse (siehe 3.2.3.9).

Für die Infektion mit definierter MOI (engl. *multiplicity of infection*, MOI) wurden 4×10^5 MDBK-Zellen in eine Vertiefung einer 6-Well-Platte in 2 ml Medium ausgesät. 2-4 h danach wurde das Medium von den Zellen pipettiert und durch 2 ml frisches Medium ersetzt. Anschließend wurden die Zellen mit MOI 0,1 in 2 ml Gesamtvolumen infiziert. 1 h nach der Infektion wurde das infektiöse Medium von den Zellen pipettiert, 3-mal mit 1 ml PBS gewaschen und 2 ml Medium auf die Zellen gegeben. Daraufhin wurden die Zellen für 72 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand gesichert, mittels 0,22 µm Sterilfilter (Minisart™, Sartorius, Göttingen) filtriert und bei -80°C gelagert. Die Bestimmung des Virustiters erfolgte wie in 3.2.3.8 beschrieben. Des Weiteren erfolgte der Nachweis von infizierten Zellen mittels anti-NS3 Immunfluoreszenzanalyse (siehe 3.2.3.9).

3.2.3.8 Bestimmung des Virustiters von Zellkulturüberständen (Titration)

Die Bestimmung des Virustiters von Zellkulturüberständen aus Elektroporationen (siehe 3.2.3.5), Infektionen (siehe 3.2.3.7) und aus *Trans*-Komplementationsassays (siehe 3.2.3.11) erfolgte mithilfe der Endpunktverdünnung. 100 µl Medium wurden in die Wells einer 96-Well Platte vorgelegt. Je nach dem erwarteten Virustiter wurde eine Vorverdünnung von 1:10 oder 1:100 des Überstandes in Medium vorgenommen. 50 µl des Überstandes bzw. der Verdünnung wurden in die erste Reihe der 96-Well Mikrotiterplatte gegeben. Standardmäßig erfolgte eine 4-fach Bestimmung pro Überstand bzw. Verdünnung. Mithilfe einer 8-fach Mehrkanalpipette wurde in 50 µl – Schritten seriell von Reihe zu Reihe verdünnt (jeweils 1:3). Im Anschluss wurden die MDBK-Zellen einer konfluent bewachsenen 10 cm Schale wie in 3.2.3.1 beschrieben geerntet und in insgesamt 12 ml Medium aufgenommen. 2 ml dieser Suspension wurden mit 8 ml Medium gemischt. Danach wurden 100 µl dieser Zellsuspension pro Vertiefung der 96-Well Mikrotiterplatte gegeben, in denen der Zellkulturüberstand seriell verdünnt worden war. Im Anschluss wurden die Zellen für 72 h bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Immunfluoreszenzanalyse mittels anti-NS3 (siehe 3.2.3.9) und die Bestimmung der infizierten Wells mithilfe des Mikroskops.

Titerberechnungen bei Endpunktverdünnungsverfahren erfolgen stets mithilfe statistischer Schätzverfahren. In der vorliegenden Arbeit wurde die Formel nach Spaermann und Kärber verwendet, um die Virustiter in TCID₅₀ zu berechnen (Kärber, 1931).

$$m = x_i \frac{d}{2} - d \sum R_i$$

- m negativer dekadischer Logarithmus des Titers bezogen auf das Testvolumen, d.h. der Titer des Testvolumens ergibt sich aus 10^{-m} . Da als Testvolumen 50 µl eingesetzt wurden, muss dieser Wert mit 20 multipliziert werden, um die Anzahl infektiöser Viren je ml zu erhalten (TCID₅₀)
- x_i Logarithmus der kleinsten Verdünnung, die zur Infektion aller vier Replikate einer Verdünnungsstufe führt (z.B. in Stufe 6 wäre $x_i = \lg(1/72.900) = -4,86$)
- d Logarithmus des Verdünnungsfaktors
- $\sum R_i$ Summe der Reaktionsraten; in diese Summe werden alle positiven Reaktionen ab der höchsten Verdünnungsstufe, in der alle Replikate positiv sind, einbezogen und durch die Anzahl der Replikate dividiert (wenn in der nächsten Verdünnungsstufe also noch 3 von 4 Replikaten positiv reagieren ist $\sum R_i = 1 + \frac{3}{4} = 1,75$)

3.2.3.9 Immunfluoreszenzanalyse

Für die Immunfluoreszenzanalyse wurden die Zellen zunächst mit 2 % (w/v) Paraformaldehyd (Affymetrix, Santa Clara (CA), USA) in PBS⁺⁺ für 20 min bei 4°C fixiert. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 ml 0,5 % N-Octyl-β-D-Glucopyranosid (w/v) in PBS⁺⁺ für 7 min bei 4°C permeabilisiert. Daraufhin wurden die Zellen mit PBS⁺⁺ gewaschen und für 1 h bei 37 °C mit dem Primärantikörper anti-NS3/NS2-3 (mAk 8.12.7) (Corapi et al., 1990) in der Verdünnung 1:40 in PBS⁺⁺ verwendet. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit dem Sekundärantikörper anti-Maus-Cy3 (Dianova, Hamburg) in der Verdünnung 1:2000 in PBS⁺⁺ für 1 h bei 37°C inkubiert. Hierbei erfolgte gleichzeitig der Nachweis der Zellkerne mittels DAPI (1:5000). Im Anschluss wurden die Zellen 3-mal mit PBS⁺⁺ gewaschen und mit dem Immunfluoreszenzmikroskop analysiert und dokumentiert.

3.2.3.10 Metabolische Markierung von Proteinen mit ³⁵S-Methionin und ³⁵S-Cystein

Die metabolische Markierung von Proteinen mit ³⁵S-Methionin und ³⁵S-Cystein (Met-[S35]-label, Hartmann Analytic, Braunschweig) erfolgte im Anschluss an die T7-Vaccinia-Expression in Huh7-T7-Zellen (siehe 3.2.3.2). 2 h nach der DNA-Transfektion (siehe 3.2.3.3) wurden die transfizierten Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 ml Methionin- und Cystein-freiem Medium überschichtet (DMEM ohne L-Methionin, L-Cystein und L-Glutamin, mit 1 % GlutaMAX (Life Technologies (Gibco), Darmstadt) und für 30 min bei 37°C inkubiert. Daraufhin erfolgte ein Wechsel des Medium und die Zellen wurden mit 1 ml Medium überschichtet. Anschließend wurden dem Medium 70 µCi des Met-[S35]-labels hinzugefügt und durch Schwenken gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 6 h wurde das Medium von den Zellen abgenommen und mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden 250 µl RIPA-G Puffer, der mit 1 mM Proteaseinhibitor (Pefabloc-SC, Roth, Karlsruhe) versetzt war, zu den Zellen gegeben und die Zellen unter Schwenken lysiert. Die Zelllysate wurden bis zur Immunpräzipitation bei -20°C gelagert.

3.2.3.11 Trans-Komplementationsassay

Für den *Trans*-Komplementationsassay wurde i.d.R. 1/3 einer konfluent bewachsenen 10 cm Zellkulturschale SK-6 Zellen (ca. 3×10^6 Zellen) mit 1 µg *in vitro* transkribierter RNA von NCP7 NS2-Ubi-NS3 elektroporiert (siehe 3.2.3.5). Die Zellen einer Elektroporation wurden in eine Vertiefung einer 6-Well-Platte ausgesät. 6 h nach der Elektroporation wurden die Zellen einmal mit 1 ml 1 x PBS gewaschen und mit 1 ml MEM (ohne alles) überschichtet. Anschließend erfolgte die Infektion der Zellen mit Vaccinia-Virus MVA-T7^{pol} durch die Zugabe von 5 µl Stocklösung des Virus. 1 h nach Infektion wurde der infektiöse Überstand abgenommen und die Zellen wurden mit 1 ml 1 x PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen mit 1 ml Vollmedium überschichtet und es erfolgte die DNA-Transfektion von 6 µg Plasmid-DNA mit Metafectene® (siehe 3.2.3.3). 18-24 h nach der DNA-Transfektion wurden die Zellkulturüberstände geerntet und mittels 0,22 µm Filter sterilfiltriert. Anschließend erfolgte die Bestimmung des Virustiters wie in 3.2.3.8 beschrieben. Die Inkubationszeit wurde auf 24 h reduziert,

da es möglich ist, dass sich die initial infizierten Zellen, aufgrund der Zytotoxizität des NCP7 NS2-Ubi-NS3, zu einem späteren Zeitpunkt nicht mehr detektieren lassen. Die Berechnung des entsprechenden Virustiters erfolgte, wie in 3.2.3.8 beschrieben.

3.2.4 Arbeiten mit Proteinen

3.2.4.1 SDS-PAGE

Die Sodiumdodecyl-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteingemischen wurde mithilfe von Tracingelen nach Schägger und Jagow durchgeführt (Schägger and von Jagow, 1987). Für darauffolgende Western Blot Analysen (siehe 3.2.4.2) wurden kleine Gele mit den Maßen 8,0 x 6,0 cm verwendet, welche mithilfe des Mini-PROTEAN Tetra Cell System (Biorad, München) hergestellt wurden. Zur Auftrennung von Proteingemischen nach Radioimmunpräzipitation (siehe 3.2.4.3) wurden große Gele mit den Maßen 18,0 cm x 16,0 cm verwendet. Je nach Molekulargewicht des zu untersuchten Proteins variierte der Anteil an Acrylamid (Acrylamid 4K-Lösung (40 %), Applichem, Darmstadt), mit einem Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid von 29:1, zwischen 8-10 % (w/v). Die Polymerisation des Acrylamidgels wurde durch die Zugabe von 0,08 % (w/v) Ammoniumpersulfat (APS) und 0,1 % (w/v) TEMED gestartet.

Standardmäßig wurden die Zellen einer konfluent bewachsenen Vertiefung einer 6-Well Platte in 120-160 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen, lysiert und für 10 min bei 95°C denaturiert. 20 µl dieses Lysates wurden i.d.R. genutzt um eine Tasche eines kleinen SDS-Polyacrylamidgels zu beladen. Nach Radioimmunpräzipitationen mittels Protein-A-Sepharose-Komplexen erfolgte die Denaturierung in 80 µl SDS-Probenpuffer für 10 min bei 95°C, wobei die gesamte Probe in eine Tasche eines großen Polyacrylamidgels pipettiert wurde. Als Referenz wurde parallel zu den Proben ein Größenstandard aufgetragen (Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific, Schwerte).

Als Laufpuffer dienten Anoden- und Kathodenpuffer. Bei kleinen Polyacrylamidgelen erfolgte die Auftrennung der Proben bei einer Spannung von 120 V für ca. 60-90 min bei RT. Bei großen Polyacrylamidgelen wurde eine Spannung von 50 V angelegt und die Auftrennung erfolgt über Nacht.

3.2.4.2 Western Blot (Tank-Blot)

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mithilfe des „Tank-Blot“ Verfahrens unter Verwendung einer TetraCell Apparatur (Biorad, München) auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Blotkissen, Filterpapiere und die Nitrozellulosemembran wurden in Transferpuffer eingeweicht. Auch das Polyacrylamidgel wurde im Transferpuffer geschwenkt. Der Blot wurde wie folgt aufgebaut: 1 x Blotkissen, 2 x Schichten Filterpapier, Acrylamidgel, Nitrozellulosemembran, 2 x Schichten Filterpapier, 1 x Blotkissen. Danach wurden die Luftblasen, die bei dem Zusammenbau

entstanden waren, entfernt. Der Blot wurde in der Gelkammer so orientiert, dass die Membran in Richtung der Kathode ausgerichtet war. Des Weiteren befand sich in der Blotkammer ein eisgekühlter Accu, um den Transfer zu kühlen. Anschließend wurde die Blotkammer mit Transferpuffer aufgefüllt und eine Spannung von 100 V für 1 h angelegt. Sollten größere Proteine untersucht werden, die größer oder gleich 130 kDa waren, wurde die Inkubationszeit auf 1,5 h verlängert. Nach dem Protein-Transfer wurde die Membran für 30 min mit 5 % (w/v) Magermilchpulver in PBS-Tween20 (0,05 % (v/v)) (Blockierlösung) unter Schwenken blockiert. Anschließend wurde die Membran mit dem Erstantikörper für 1 h bei RT schwenkend inkubiert, wobei dieser entsprechend in Blockierlösung verdünnt war.

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Erstantikörper in folgenden Verdünnungen verwendet: anti-GST (1:5.000), anti-HA.11 (16B12) (1:1.000); anti-HA (C29F4) (1:5.000), anti-myc (9B11) (1:5.000), anti-E2 (SCR48 6.6.11) (1:5), anti-NS3/NS2-3 (mAk 8.12.7) (1:10), anti-NS4A (GH4A1 [4B7]) (1:5); anti-NS5A (GLBVD5A1 [11C]) (1:5) und anti-NS5B (GLBVD5B1 [9A]) (1:5). Der Blot wurde anschließend dreimal mit PBS-T gewaschen und danach mit dem entsprechenden Sekundärantikörper inkubiert (schwenkend für 1 h bei RT). Je nach Spezies des Primärantikörper wurde der entsprechende Sekundärantikörper verwendet. Standardmäßig wurden HRP-konjugierte Sekundärantikörper (anti-Maus-HRP bzw. anti-Rabbit-HRP) in der Verdünnung 1:10.000 verwendet, wobei die Detektion unter der Verwendung der Chemilumineszenz-Lösung (Perkin Elmer) nach den Angaben des Herstellers und mithilfe des LAS-4000 durchgeführt wurde. Für quantitative Analysen mithilfe des Odyssey SA infrared imaging systems (*LI-COR*[®]) wurde IRDye[®] 800CW Donkey-anti-Mouse in der Verdünnung 1:10.000 verwendet. Nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper schlossen sich drei Waschritte mit PBS-T und die Detektion mit dem Image Analyzer (LAS-4000mini) an.

3.2.4.3 Radioimmunpräzipitation

Zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen wurde im Anschluss an die T7-Vaccinia-Expression in Huh7-T7-Zellen (siehe 3.2.3.2) und die metabolische Markierung von Proteinen mit ³⁵S-Methionin und ³⁵S-Cystein (siehe 3.2.3.10) eine Immunpräzipitation durchgeführt. Das Lysat (250 µl) wurde zunächst für 30 min bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Anschließend erfolgte das Vorklären des Lysats durch Zentrifugation (30 min, 16.000 x g, 4°C). Daraufhin wurden 200 µl des Überstandes in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 100 µl Hybridomüberstand des Primärantikörpers anti-NS3/NS2-3 (mAk 8.12.7) versetzt. Der Ansatz wurde für 1 h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 50 µl Protein-A-Sepharose Suspension (20 % Protein-A-Sepharose in RIPA-G Puffer) zu dem Lysat/Antikörpergemisch gegeben und es erfolgte die Inkubation für 1 h bei 4°C auf dem Drehrad. Im Anschluss wurde die Suspension für 1 min bei 16.000 x g bei 4°C zentrifugiert und es erfolgte ein Waschschrift mit 500 µl RIPA-G Puffer. Dieser wurde im Anschluss noch zweimal

wiederholt. Daraufhin wurde das Pellet in 80 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und die Proteine für 10 min bei 95°C denaturiert. Nach der kurzen Zentrifugation des Ansatzes (15 sek, 16.000 x g, RT) wurde der Überstand vollständig in eine Tasche eines großen SDS-Polyacrylamidgels pipettiert und entsprechend den Angaben in 3.2.4.1 aufgetrennt. Nach der Auftrennung der Probe wurde das Polyacrylamidgel in Fixierlösung (40 % Methanol (v/v), 10 % Essigsäure (v/v)) fixiert und getrocknet. Im Anschluss daran wurde ein Imaging Screen (Fuji) für 3 Tage aufgelegt, der daraufhin mit dem Phosphorimager (Typhoon, FLA-7000) ausgelesen und dokumentiert wurde.

4. Ergebnisse

Eine Besonderheit der *Flaviviridae* ist die Beteiligung von NS-Proteinen an der Bildung infektiöser Viruspartikel (Murray et al., 2008a). In der vorliegenden Doktorarbeit wurden Untersuchungen zur pestiviralen Virionmorphogenese durchgeführt. Insbesondere stand dabei die Rolle des Nichtstrukturproteins NS2-3 bzw. der NS2-3 Spaltprodukte NS2 und NS3 im Zentrum der Untersuchungen. In dieser Arbeit wurde dabei der molekulare Mechanismus genauer untersucht, welcher es Pestiviren ermöglicht, in Abwesenheit von ungespaltenem NS2-3 Virionen zu generieren.

Für die Bildung infektiöser Virionen sind Pestiviren in der Regel auf die ungespaltene Form des NS2-3 Proteins angewiesen. Diese Besonderheit von Pestiviren konnte experimentell dadurch belegt werden, dass die funktionelle Trennung von NS2 und NS3 durch eine Ubiquitin- oder durch eine IRES-Insertion zur Inhibition der Virionmorphogenese führt (Agapov et al., 2004; Moulin et al., 2007). Interessanterweise wird ungespaltenes NS2-3 für die Ausbildung von infektiösen HCV-Partikeln in Zellkultur nicht benötigt, obwohl dieses sehr nah mit Pestiviren verwandt ist (Jirasko et al., 2008).

In den vergangenen Jahren ist es in Zellkultur gelungen, Pestiviren an die Bildung von infektiösen Virionen in Abwesenheit von ungespaltenem NS2-3 zu adaptieren (NS2-3-unabhängig) (Klemens et al., 2015; Lattwein et al., 2012). In revers-genetischen Untersuchungen zeigte sich, dass in einem pestiviralen Genom, in dem NS2 und NS3 entweder durch eine Ubiquitininsertion oder durch eine EMCV-IRES getrennt sind, für eine effiziente Virionmorphogenese in Abwesenheit von ungespaltenem NS2-3 zwei Aminosäureaustausche vorliegen müssen. Diese sind im C-terminalen Teil der Proteasedomäne des NS2 (E440V) und in der NS3 Proteasedomäne (V132A) lokalisiert (Klemens et al., 2015). Darüber wie diese beiden Aminosäureaustausche die Virionmorphogenese in Abwesenheit von NS2-3 eine effiziente Virionmorphogenese ermöglichen, war bisher noch wenig bekannt. Zur Aufklärung der molekularen Grundlagen für diesen Funktionsgewinn (engl. „*gain of function*“) war die strukturelle Untersuchung des beteiligten Proteinkomplexes von entscheidender Bedeutung. In der hier vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen durchgeführt mit dem Ziel, den Beitrag der Mutation V132A zur NS2-3-unabhängigen Virionmorphogenese und des zugrundeliegenden molekularen Mechanismus, anhand von Struktur-Funktionsuntersuchungen, besser zu verstehen (Dubrau et al., 2017).

4.1 Die NS3 Aminosäure 132 ist an der Oberflächeninteraktion zwischen der NS3 Proteasedomäne und der NS4A Kink-Region beteiligt

Struktur-Funktionsuntersuchungen stellen eine wesentliche Grundlage für das ständig wachsende Verständnis in der molekularen Virologie dar. In der Arbeitsgruppe von F. Rey (Institut Pasteur, Paris) konnte die Röntgenkristallstruktur eines CSFV NS3/4A Komplexes gelöst werden. Die Analyse dieser Struktur bildete in Kombination mit den hier dargestellten funktionellen Experimenten die Grundlage für die mechanistische Aufklärung der Rolle von Konformationsänderungen des NS3/4A-Komplexes für die pestivirale Virionmorphogenese. Die Strukturaufklärung des CSFV NS3/4A Komplexes wurde mithilfe einer sog. „*single chain protease*“ (SCP) (NS4A₃₇NS3) durchgeführt (Abb. 4.1 A). Dabei handelt es sich um ein artifiziell aufgebautes Polyprotein, welches folgendermaßen aufgebaut ist: His-Epitop (7x) zur Affinitätsreinigung, TEV-Spaltstelle, CSFV NS4A (AS 21-57), GSGS-Verbindungssequenz, CSFV NS3 (AS 1-683) und NS4A (AS 1-8). Zur Verbesserung der Löslichkeit dieses Fusionsproteins wurde die N-terminale NS4A Transmembrandomäne (AS 1-20) deletiert. Für die Proteinexpression und die Kristallisation wurde eine proteolytisch inaktive Variante NS4A₃₇NS3 (3/S163A) mit einer Alaninmutation im aktiven Zentrum der NS3 Protease genutzt. Die genauen Bedingungen der Expression, Aufreinigung, Kristallisation und Strukturauswertung wurden detailliert beschrieben (Dubrau et al., 2017).

Die Kristallisation des CSFV NS3/4A Komplexes ermöglichte es, die Struktur von NS3 (Protease- und Helikasedomäne) und seinem funktionellen Kofaktor NS4A, sowie ihre Interaktionen miteinander zu bestimmen (Dubrau et al., 2017). Da in den Untersuchungen dieser Arbeit die NS3 Proteasedomäne im Komplex mit NS4A im Fokus steht, wird im Folgenden nur auf diesen Anteil der Kristallstruktur genauer eingegangen. Aus der Kristallstruktur des CSFV NS3/4A Komplexes wird deutlich, dass sich der Proteasekofaktor NS4A mit den Aminosäuren 21-40 (auch als Zentralpeptid bezeichnet) in den N-terminalen Teil der NS3 Proteasedomäne einlagert und somit ein integraler Bestandteil des NS3/4A-Komplexes ist (Abb. 4.1 B). In dieser Kristallstruktur war es zum ersten Mal möglich, die Positionierung der NS4A Aminosäuren 41-49 des NS4A (im Folgenden als „Kink-Region“ bezeichnet) aufzuklären. Für die C-terminalen Aminosäuren des NS4A (AS 50-57) konnten, unter den gewählten Bedingungen, in der Kristallstruktur keine ausreichende Elektronendichte zugeordnet werden, sodass deren Positionierung relativ zum NS3 nicht bestimmt werden konnte. Die besondere neue Erkenntnis aus dieser NS3/4A Komplexstruktur war, dass die Aminosäuren 41-49 der NS4A Kink-Region Interaktionen mit einem spezifischen Oberflächenareal um Aminosäure 132 (CSFV: Methionin; BVDV: Valin) der NS3 Proteasedomäne eingehen (Abb. 4.1 B und C), die eine kritische Determinante der NS2-3-unabhängigen Virionmorphogenese darstellt (Klemens et al., 2015). An der Ausbildung der NS3/4A-Kink Oberflächeninteraktion sind neben der NS3-Aminosäure 132 vor allem die hydrophoben Seitenketten der NS4A-Aminosäuren L45 und Y47 beteiligt (Abb. 4.1 C).

Der für die NS2-3-unabhängige BVDV Virionmorphogenese kritische Aminosäureaustausch in der NS3 Proteasedomäne von Valin zu Alanin an Position 132 (V132A) beinhaltet die Reduktion des hydrophoben Charakters der Aminosäureseitenkette an dieser Position. Aufgrund dieser Tatsache wurde die Hypothese aufgestellt, dass die molekulare Bedeutung der Mutation V132A in der Verminderung der Interaktion zwischen der NS3 Proteasedomäne und der NS4A Kink-Region besteht.

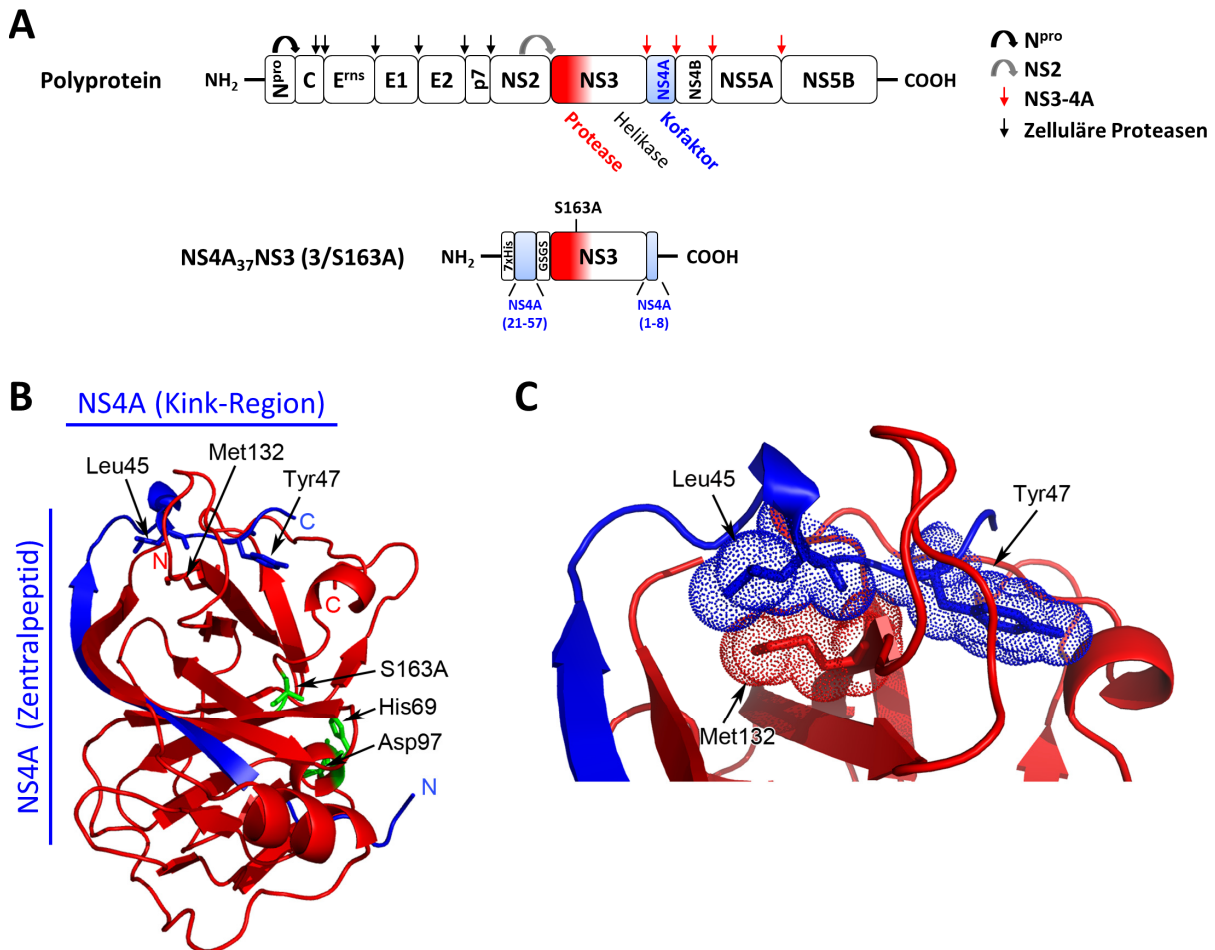


Abb. 4.1: Die NS3-Aminosäure 132 ist an der Oberflächeninteraktion zwischen der NS3 Proteasedomäne und der NS4A Kink-Region im NS3/4A Komplex beteiligt. (A) Schematische Darstellung des pestiviralen Polyproteins (oben) und der davon abgeleiteten *single chain protease* NS4A₃₇NS3 (3/S163A) (unten). Die Strukturproteine (C, E^{Erns}, E1, E2) und NS-Proteine (N^{pro}, p7, NS2, NS4B, NS5A, NS5B) sind eingezeichnet. Die NS3 Proteasedomäne (rot) und -Helikasedomäne, sowie der Kofaktor NS4A (blau) sind hervorgehoben. Die Proteasespaltstellen für N^{pro} (∩ - schwarz), zellulären Proteasen (↓ - schwarz), NS2 (∩ - grau) und NS3-4A (↓ - rot) sind eingezeichnet. 3/S163A: proteolytisch inaktive NS3-Protease; 7xHis: His-Epitop; GSGS: Linker. (B) Ausschnitt aus der Röntgenkristallstruktur des CSFV NS3/4A-Komplexes. Dargestellt ist hier die Zusammenlagerung der NS3 Proteasedomäne mit dem NS4A Kofaktor. Die Helikasedomäne ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt. Das NS4A Zentralpeptid (β-Faltblatt, AS 21-40) und die sich anschließende NS4A Kink-Region sind hervorgehoben. Die Aminosäurepositionen Met132 in der NS3 Proteasedomäne, sowie Leu45 und Tyr47 in der NS4A Kink-Region, sind eingezeichnet. Katalytische Triade (grün): His69, Asp97, S163A (proteolytisch inaktiv); N: N-terminal; C: C-terminal. (C) Vergrößerter Ausschnitt der Interaktionsfläche zwischen der NS3 Proteasedomäne und der NS4A Kink-Region. Die hydrophoben Wechselwirkungen der Aminosäuren Met132 (NS3), Leu45 und Tyr47 (NS4A) sind mittels Sphären verdeutlicht. Die Abbildung wurde mit Unterstützung von M. Alejandra Tortorici erstellt. Adaptiert aus Dubrau et al., 2017.

Die NS3-4A Protease ist durch seine Serinprotease-Aktivität von essentieller Bedeutung für die Prozessierung des pestiviralen Polyproteins (Tautz et al., 2000; Xu et al., 1997). Bei der SCP NS4A₃₇NS3 handelt es sich um ein artifizielles Polyprotein, da ein verkürztes mit einem His-Reinigungsepitop flankiertes NS4A durch eine flexible Verbindungssequenz mit dem N-Terminus von NS3 verbunden wurde (Abb. 4.1 A). Deshalb sollte verifiziert werden, ob die Wildtyp Form von SCP NS4A₃₇NS3 in der Lage ist, einen funktionellen NS3/4A-Komplex auszubilden, der Serinprotease-Aktivität aufweist.

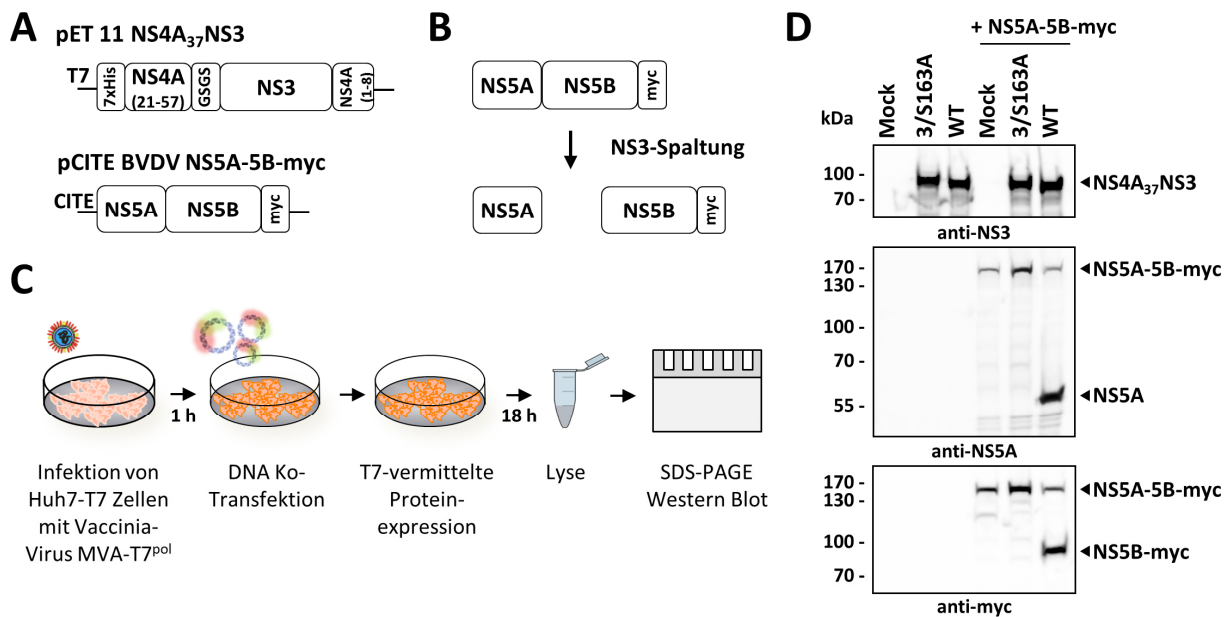


Abb. 4.2: Die NS4A₃₇NS3 *single chain protease* (SCP) besitzt Serinprotease-Aktivität. (A) Schematische Darstellung von pET 11 NS4A₃₇NS3 (kodiert für die CSFV SCP) und pCITE BVDV NS5A-5B-myc (kodiert für das Spaltstellensubstrat). Es wurden zwei Varianten des pET 11 NS4A₃₇NS3 getestet: Wildtyp (WT) und die proteolytisch inaktive Form 3/S163A. Das Konstrukt pCITE NS5A-NS5B-myc kodiert für den Proteinvorläufer NS5A-NS5B des BVDV-1 Stammes NCP7/CP7. NS5B ist C-terminal mit einem myc-Epitop fusioniert. (B) Schema der Analyse der NS4A₃₇NS3 Proteaseaktivität. Bei erfolgreicher Spaltung des Substrats NS5A-NS5B-myc durch die NS4A₃₇NS3 Serinproteasekomplex entstehen die Spaltprodukte NS5A und NS5B-myc. (C) Schematischer Ablauf des Experimentes zur Ermittlung der NS4A₃₇NS3 Proteaseaktivität. (D) Western Blot Analysen des Spaltungsassays. Als Primäntikörper wurden anti-NS3 zur Detektion der Expression der CSFV NS4A₃₇NS3 Protease und anti-NS5A sowie anti-myc zur Detektion des Spaltstellensubstrates und der Spaltprodukte NS5A und NS5B-myc wie in 3.2.4.2 angegeben eingesetzt. Als Sekundäntikörper wurde anti-Maus-HRP verwendet. 3/S163A: Negativkontrolle, proteolytisch inaktive NS3 Protease; WT: Wildtyp; kDa: Proteinmarker in Kilodalton.

Dafür wurde zunächst eine Form generiert, in der das katalytische Serin der NS3-Protease nicht inaktiviert war (Wildtyp: WT). Zur Überprüfung, ob diese Form katalytisch aktiv ist, wurden NS4A₃₇NS3 (WT oder 3/S163A) und das Spaltstellensubstrat NS5A-5B-myc mit dem Huh7-T7/MVA-T7^{pol}-System ko-exprimiert, um die NS3/4A-vermittelte Spaltung von NS5A-5B-myc nachzuweisen. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Proteinproben mittels SDS-PAGE und Western Blot hinsichtlich der Spaltprodukte NS5A bzw. NS5B-myc analysiert (Abb. 4.2 A, B und C). Es zeigte sich, dass beide Formen der SCP NS4A₃₇NS3 (WT oder 3/S163A) und das Spaltstellensubstrat NS5A-NS5B-myc erfolgreich in

Huh7-T7 Zellen exprimiert wurden (Abb. 4.2 D; oberer WB, anti-NS3 und unterer WB, anti-myc). Es wurde deutlich, dass NS4A₃₇NS3 (WT) einen funktionell aktiven Serinproteasekomplex ausbildet, da sich bei der Ko-Expression von NS5A-NS5B-myc und NS4A₃₇NS3 (WT) die Spaltprodukte NS5A und NS5B-myc im Blot nachweisen ließen (Abb. 4.2 D, anti-NS5A und anti-myc). Im Gegensatz dazu konnten diese Spaltprodukte bei der Ko-Expression von NS5A-NS5B-myc und NS4A₃₇NS3 (3/S163A) nicht detektiert werden (Abb. 4.2 D).

4.2 Aminosäureaustausche an der Interaktionsfläche zwischen der NS3 Proteasedomäne und der NS4A Kink-Region führen zur Abschwächung dieser Interaktion

Die Analyse der Kristallstruktur der CSFV NS3-4A Protease hat gezeigt, dass die Aminosäure 132 zentraler Bestandteil der Interaktionsfläche zwischen der NS3-Proteaseoberfläche und der NS4A Kink-Region ist. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Mutation 3/V132A essentiell für die NS2-3-unabhängige Virionmorphogenese ist (Klemens et al., 2015). Da bei dem Austausch von Valin zu Alanin (3/V132A) der hydrophobe Charakter der Aminosäureseitenkette vermindert wird, lag die Hypothese nahe, dass eine Verringerung der Oberflächeninteraktion zwischen der NS3 Proteasedomäne und der NS4A Kink-Region die molekulare Voraussetzung für die NS2-3-unabhängige Virionmorphogenese ist. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde ein TEV-Protease (TEV^{pro})-Spaltungsassay entwickelt, mit dem das Ausmaß der NS3/4A-Kink Interaktion experimentell untersucht werden konnte (Abb. 4.3 A). Als Basis für diesen Assay diente die Zugänglichkeit einer TEV-Proteasespaltstelle am C-Terminus der NS4A Kink-Region für die ko-exprimierte TEV-Protease (TEV^{pro}). Bezugnehmend auf die strukturellen Daten des NS3/4A-Komplexes war die grundlegende Annahme, dass im authentischen NS3/4A-Komplex die starke NS3/4A-Kink Assoziation zu einer kompakten Konformation des NS3/4A-Komplexes führt. Diese kompakte Konformation ermöglicht voraussichtlich nur eine geringe Zugänglichkeit der TEV-Spaltstelle für die TEV^{pro} und damit eine ineffiziente TEV^{pro}-vermittelte Spaltung am Ende der NS4A Kink-Region (Abb. 4.3 A - links). Im Gegensatz dazu würden Mutationen an der NS3/4A-Kink Grenzfläche, die eine Abschwächung dieser Interaktion bewirken, eine verbesserte Zugänglichkeit der TEV-Proteasespaltstelle und erhöhte TEV^{pro}- Spaltungsraten ermöglichen (Abb. 4.3 A – rechts).

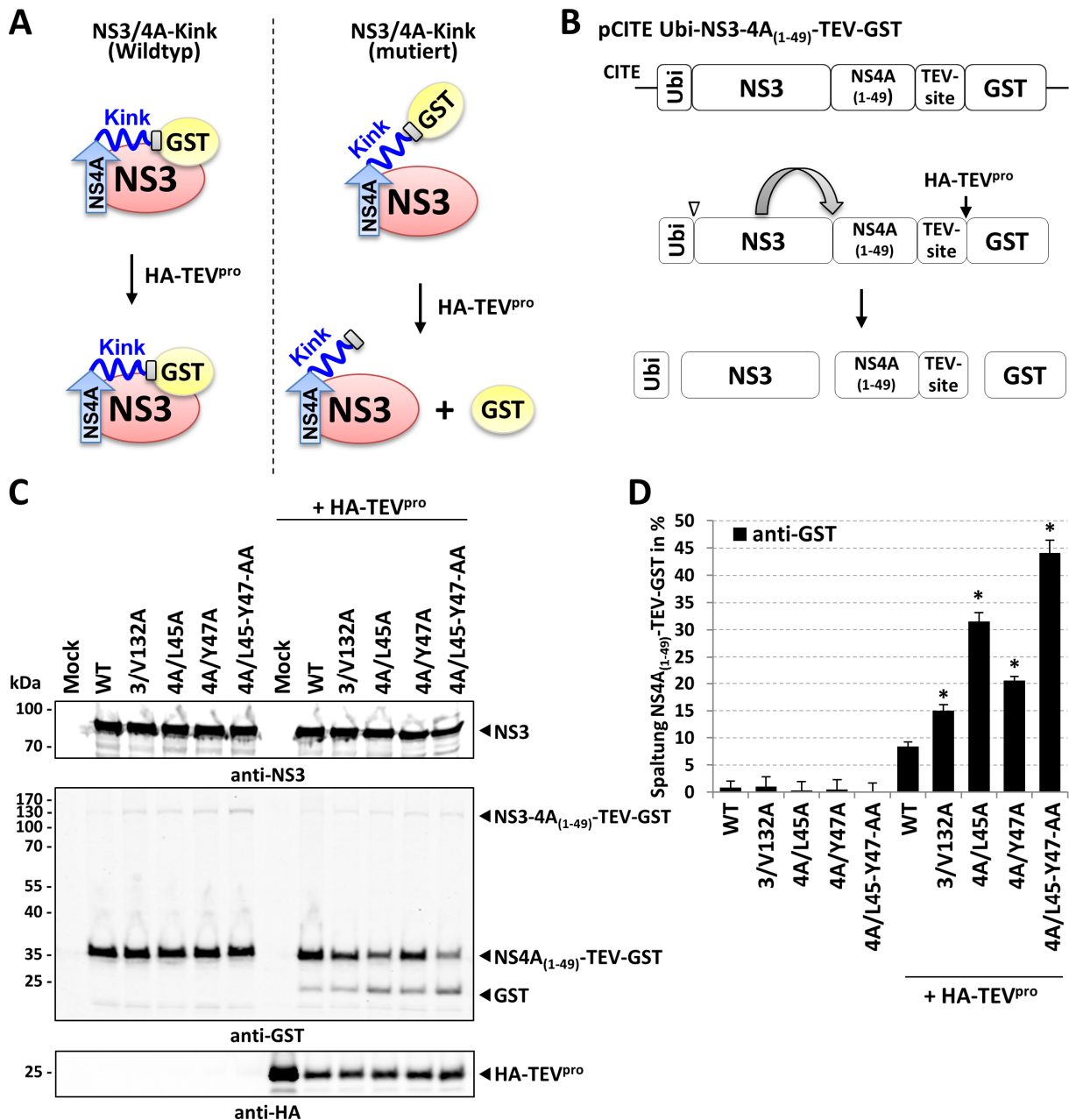


Abb. 4.3: Die NS3/4A-Kink Oberflächeninteraktion wird durch NS3 und NS4A Alaninmutationen an der NS3/4A-Kink Grenzfläche abgeschwächt. (A) Schema des TEV-Protease (TEV^{pro})-Spaltungsassays. NS3 (rot), NS4A (blau), die NS4A Kink-Region₍₄₁₋₄₉₎ (Kink - blau) und die sich daran anschließende TEV-Spaltstelle (grau), sowie GST (gelb) sind eingezeichnet. Im Wildtyp (WT) NS3/4A-Komplex ist die Interaktion zwischen der NS3 Proteasedomäne und der NS4A Kink-Region stark, wodurch eine kompakte Konformation ausgebildet wird, welche die TEV^{pro}-vermittelte GST-Abspaltung vermindert (links). Alaninmutationen an der NS3/4A-Kink Grenzfläche bewirken eine Verminderung der NS3/4A-Kink Assoziation und ermöglichen eine verstärkte GST-Abspaltung (rechts). Dargestellt sind die hypothetischen NS3/4A-Komplexkonformationen im WT (kompakt, links) und in Anwesenheit von NS3/4A-Kink Mutationen (offenere Konformation, rechts). HA-TEV^{pro}: TEV-Protease, mit einem N-terminalen HA-Epitop. (B) Oben, schematische Darstellung von pCITE Ubi-NS3-4A₍₁₋₄₉₎-TEV-GST. Das Konstrukt kodiert für ein Fusionsprotein aus Ubiquitin (Ubi), BVDV NS3, NS4A₍₁₋₄₉₎, TEV-Spaltstelle und GST in einem ORF (siehe Text für genauere Erläuterungen). Das translatierte Polyprotein (Mitte) und die prozessierten Proteine sind dargestellt (unten). Die Proteasespaltstellen für zelluläre Ubiquitin-C-terminale Hydrolasen (∇), NS3 (∩) und TEV^{pro} (↓) sind eingezeichnet. (C) Western Blot Analysen des TEV^{pro}-Spaltungsassays. Huh7-T7 Zellen wurden mit Vaccinia-Virus MVA-T7^{pol} für 1h bei 37°C infiziert. Die infizierten Zellen wurden anschließend mit pCITE Ubi-NS3-4A₍₁₋₄₉₎-TEV-GST Plasmid-DNA (WT bzw. Derivate) und mit pGEM-T (links) oder mit pGEM-T HA-TEV^{pro} (rechts: + HA-TEV^{pro}) ko-transfiziert und für 18 h bei 37°C inkubiert. Nach der Zelllyse wurden die Proteinproben mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Die verwendeten

Primärantikörper waren anti-NS3, anti-GST und anti-HA. Als Sekundärantikörper diente anti-Maus IRDye 800CW, dessen Fluoreszenz mithilfe eines Odyssey SA infrared imaging systems (*LI-COR*[®]) detektiert und quantifiziert werden konnte. (D) Quantifizierung der Effizienz der GST-Abspaltung im TEV^{pro}-Spaltungsassay. Die Signalintensitäten von NS4A₍₁₋₄₉₎-TEV-GST und GST wurden quantifiziert und die NS4A₍₁₋₄₉₎-TEV-GST-Spaltungsraten in Prozent ermittelt. Der Graph stellt die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen dar (n=3). Statistische Analysen bestätigten, dass sich die einzelnen Gruppen signifikant unterscheiden (Kruskal-Wallis Test, P<0,05). (*) Unterscheidet sich statistisch signifikant vom Wildtyp (WT) (paarweise durchgeführter Mann-Whitney Test, P<0,05).

Aufgrund der durchgeführten Strukturanalysen sollte diese Interaktionsabschwächung durch Mutation von Aminosäuren möglich sein, die an der NS3/4A-Kink Interaktion beteiligt sind. Dies umfasst die Aminosäure 132 der NS3-Oberfläche als auch Aminosäuren der NS4A Kink-Region, wie L45 oder Y47 (Abb. 4.1 B und C). Für den TEV^{pro}-Spaltungsassay wurde das Expressionskonstrukt pCITE Ubi-NS3-4A₍₁₋₄₉₎-TEV-GST generiert, durch welches ein Fusionsprotein bestehend aus BVDV NS3, NS4A₍₁₋₄₉₎ (NS4A-Aminosäure 1-49; P49 ist der hypothetische C-Terminus der NS4A Kink-Region) gefolgt von einer TEV-Spaltstelle und GST, exprimiert werden kann. N-terminal von NS3 wurde ein Ubiquitin fusioniert, um die Generierung eines authentischen N-Terminus des NS3-Proteins durch zelluläre Ubiquitinhydrolasen zu gewährleisten (Abb. 4.3 B). Für die Expression der TEV-Protease wurde das Plasmid pGEM-T HA-TEV^{pro} generiert, welches eine TEV-Protease (TEV^{pro}) kodiert. Zum Nachweis der erfolgreichen Expression von HA-TEV^{pro} diente das N-terminale HA-Epitop. Die Expression beider Proteine war durch eine T7-Promotor-abhängige Transkription möglich und somit konnte die Ko-Expression von Ubi-NS3-4A₍₁₋₄₉₎-TEV-GST und HA-TEV^{pro} in Zellkultur durch das Huh7-T7/MVA-T7^{pol} System erfolgen. Zur Untersuchung der NS3/4A-Kink Interaktion wurden zusätzliche pCITE Ubi-NS3-4A₍₁₋₄₉₎-TEV-GST Derivate generiert, die Mutationen in der NS3/4A-Kink Grenzfläche aufweisen (3/V132A, 4A/L45A, 4A/Y47A und 4A/L45-Y47-AA), von denen erwartet wurde, dass sie die NS3/4A-Kink Interaktion unterschiedlich stark beeinflussen würden.

Für den TEV^{pro}-Spaltungsassay wurden Huh7-T7 Zellen mit Vaccinia-Virus MVA-T7^{pol} für 1 h bei 37°C infiziert. Danach erfolgte die Ko-Transfektion der infizierten Zellen mit pCITE Ubi-NS3-4A₍₁₋₄₉₎-TEV-GST Plasmid-DNA (WT oder 3/V132A, 4A/L45A, 4A/Y47A bzw. 4A/L45-Y47-AA) und mit pGEM-T oder mit pGEM-T HA-TEV^{pro}. Die T7-vermittelte Proteinexpression erfolgte für 18 h bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Proteinproben mittels SDS-PAGE und Western Blot mit den Primärantikörpern anti-NS3, anti-GST und anti-HA, wie in 3.2.4.2 beschrieben, analysiert. Um eine Quantifizierung der TEV^{pro}-vermittelten GST-Abspaltung durchführen zu können, wurde als Sekundärantikörper anti-Maus IRDye 800CW verwendet, dessen Fluoreszenz mithilfe des Odyssey SA infrared imaging systems (*LI-COR*[®]) detektiert und ausgewertet werden kann.

Die Western Blot Analysen zeigten, dass alle analysierten Ubi-NS3-4A₍₁₋₄₉₎-TEV-GST Fusionsproteine korrekt exprimiert und prozessiert wurden (Abb. 4.3. C - links). So ließen sich für alle Konstrukte die Prozessierungsprodukte NS3 und NS4A₍₁₋₄₉₎-TEV-GST nachweisen. In Abwesenheit von HA-TEV^{pro}

konnte kein freies GST detektiert werden, sodass der gewählte Aufbau des Konstruktes die Expression eines stabilen NS4A₍₁₋₄₉₎-TEV-GST Proteins ermöglicht und keine unspezifische Freisetzung von GST durch zelluläre Proteasen stattfindet. Die Mutationen in der NS3/4A-Kink Interaktionsfläche hatten keine detektierbaren Auswirkungen auf die Menge an NS3 bzw. NS4A₍₁₋₄₉₎-TEV-GST, da keine verstärkten Ansammlungen von Proteinvorläufern im Vergleich zur Expression von WT Ubi-NS3-4A₍₁₋₄₉₎-TEV-GST detektiert werden konnten (Abb. 4.3 C – links, vgl. WT mit 3/V132A, 4A/L45A, 4A/Y47A und 4A/L45-Y47-AA). Die Ko-Expression von Ubi-NS3-4A₍₁₋₄₉₎-TEV-GST mit HA-TEV^{pro} resultierte sowohl beim exprimierten Wildtyp Ubi-NS3-4A₍₁₋₄₉₎-TEV-GST Fusionsprotein, als auch bei allen anderen getesteten Derivaten, in der HA-TEV^{pro}-vermittelten GST-Abspaltung. Die GST-Abspaltung ging mit einer detektierbaren Abnahme der NS4A₍₁₋₄₉₎-TEV-GST Menge einher (Abb. 4.4 C – rechts). Die Western Blot Analysen ergaben, dass die Abspaltung des GST für die verschiedenen Derivate unterschiedlich effizient war (Abb. 4.3 C – rechts). Die Quantifizierung der Western Blot-Signale von NS4A₍₁₋₄₉₎-TEV-GST und GST ermöglichte die Bestimmung der jeweiligen TEV^{pro}-abhängigen NS4A₍₁₋₄₉₎-TEV-GST-Spaltungsrate. Die quantitativen Analysen des TEV^{pro}-Spaltungsassays zeigten, dass die NS4A₍₁₋₄₉₎-TEV-GST Spaltungsrate für das WT-Konstrukt mit ca. 10 % am geringsten ausfiel (Abb. 4.3 D). Alle Mutationen an der NS3/4A-Kink Interaktionsfläche begünstigten hingegen die TEV^{pro}-vermittelte Freisetzung von GST im Vergleich zum Wildtyp in unterschiedlichem Ausmaß. Für das 3/V132A Derivat konnte eine Spaltungsrate von ca. 15 % nachgewiesen werden. Die Einzelmutationen in der NS4A Kink-Region erhöhten diese Spaltungsraten weiter, wobei für das Y47A-Derivat eine Spaltungsrate von NS4A₍₁₋₄₉₎-TEV-GST von 20 % und für die L45A Variante eine GST-Abspaltung von 30 % nachgewiesen wurde. Die effizienteste GST-Abspaltung wurde für die Doppelmutante 4A/L45-Y47-AA mit einer Spaltungsrate von ca. 44 % detektiert (Abb. 4.3 D).

Durch den TEV^{pro}-Spaltungsassay konnte gezeigt werden, dass Alaninmutationen, die sich an der Interaktionsfläche zwischen der Oberfläche der NS3 Proteasedomäne und der NS4A Kink-Region befinden, zu einer erhöhten Zugänglichkeit der TEV-Spaltstelle in NS4A₍₁₋₄₉₎-TEV-GST führen. Diese erhöhte Zugänglichkeit resultiert vermutlich aus einer Abschwächung dieser Oberflächeninteraktion. Es wurde deutlich, dass diese Interaktionsreduktion sowohl durch die Mutation 3/V132A als auch durch die Aminosäuresubstitutionen L45A, Y47A und L45-Y47-AA in der NS4A Kink-Region hervorgerufen werden kann. Da diese Aminosäuren sich im NS3/4A-Komplex direkt gegenüberliegen, unterstützen diese Ergebnisse die Vermutung, dass sie unmittelbar an der Modulation der NS3/4A-Komplexkonformation beteiligt sind.

4.3 Alaninmutationen innerhalb der NS3/4A-Kink Interaktionsfläche zeigen keinen Einfluss auf die Polyproteinprozessierung

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass Alaninmutationen an der Interaktionsfläche zwischen der NS3 Proteasedomäne und der NS4A Kink-Region eine Abschwächung dieser Interaktion hervorrufen. Da die NS3-4A Protease und hierbei speziell die korrekte Einlagerung von NS4A in die NS3 Proteasedomäne essentiell für die Prozessierung des pestiviralen Polyproteins ist (Tautz et al., 2000; Xu et al., 1997), sollte im Folgenden untersucht werden, ob sich Mutationen an der NS3/4A-Kink Interaktionsfläche auf diesen Prozess auswirken.

Zur Untersuchung der pestiviralen Polyproteinprozessierung wurde das Konstrukt pT7-DI-388 verwendet, welches für die pestiviralen Proteine N^{pro}, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B kodiert (Abb. 4.4 A) (Isken et al., 2014; Klemens et al., 2015). Die Autoprotease N^{pro} generiert nach der Translation den authentischen N-Terminus des NS3. Der offene Leserahmen wird von der authentischen BVDV 5'- und 3'NTR flankiert.

Da die Transkription des Konstruktes durch einen T7-Promotor reguliert ist (Abb. 4.4 A), kann das virale Polyprotein mittels des Huh7-T7/MVA-T7^{pol} Systems unabhängig von RNA-Replikation exprimiert werden. Dadurch ermöglicht dieses System auch die Untersuchung der Polyproteinprozessierung von NS3 oder NS4A Mutationen, welche die RNA-Replikation stark reduzieren oder inhibieren (Abb. 4.4 B).

Zur Untersuchung des Einflusses von Mutationen in der NS3/4A-Kink Interaktionsfläche auf die Polyproteinprozessierung wurden die pT7-DI-388 Derivate 4A/L45A, 4A/Y47A und 4A/L45-Y47-AA hergestellt (Abb. 4.4 C). Das Derivat mit der Mutation V132A in der NS3 Proteasedomäne war bereits in einer vorangegangenen Studie generiert und untersucht worden (Klemens et al., 2015). Neben dem pT7-DI-388 Wildtyp mit intakter Polyproteinprozessierung wurde die Mutante 3/S163A mitgeführt, die eine Mutation im aktiven Zentrum der NS3 Protease aufweist somit proteolytisch inaktiv ist und als Negativkontrolle diente. Huh7-T7 Zellen wurden mit Vaccinia-Virus MVA-T7^{pol} für 1 h bei 37°C infiziert. Anschließend erfolgte die DNA-Transfektion der entsprechenden pT7-DI-388 Plasmide. Die Proteinexpression wurde für 18 h durchgeführt. Zur Analyse der Polyproteinprozessierung wurde eine Zellyse durchgeführt, gefolgt von der Auftrennung der Proteinproben mittels SDS-PAGE und Western Blot Analyse mit den anti-NS3, anti-NS4A, anti-NS5A und anti-NS5B Primärantikörpern. Die Detektion von NS4B, bzw. entsprechenden Proteinvorläufern, konnte in die Analysen nicht miteinbezogen werden, da ein NS4B-spezifischer Antikörper nicht verfügbar war. Die Primärantikörper wurden mithilfe eines anti-Maus-HRP Sekundärantikörpers detektiert.

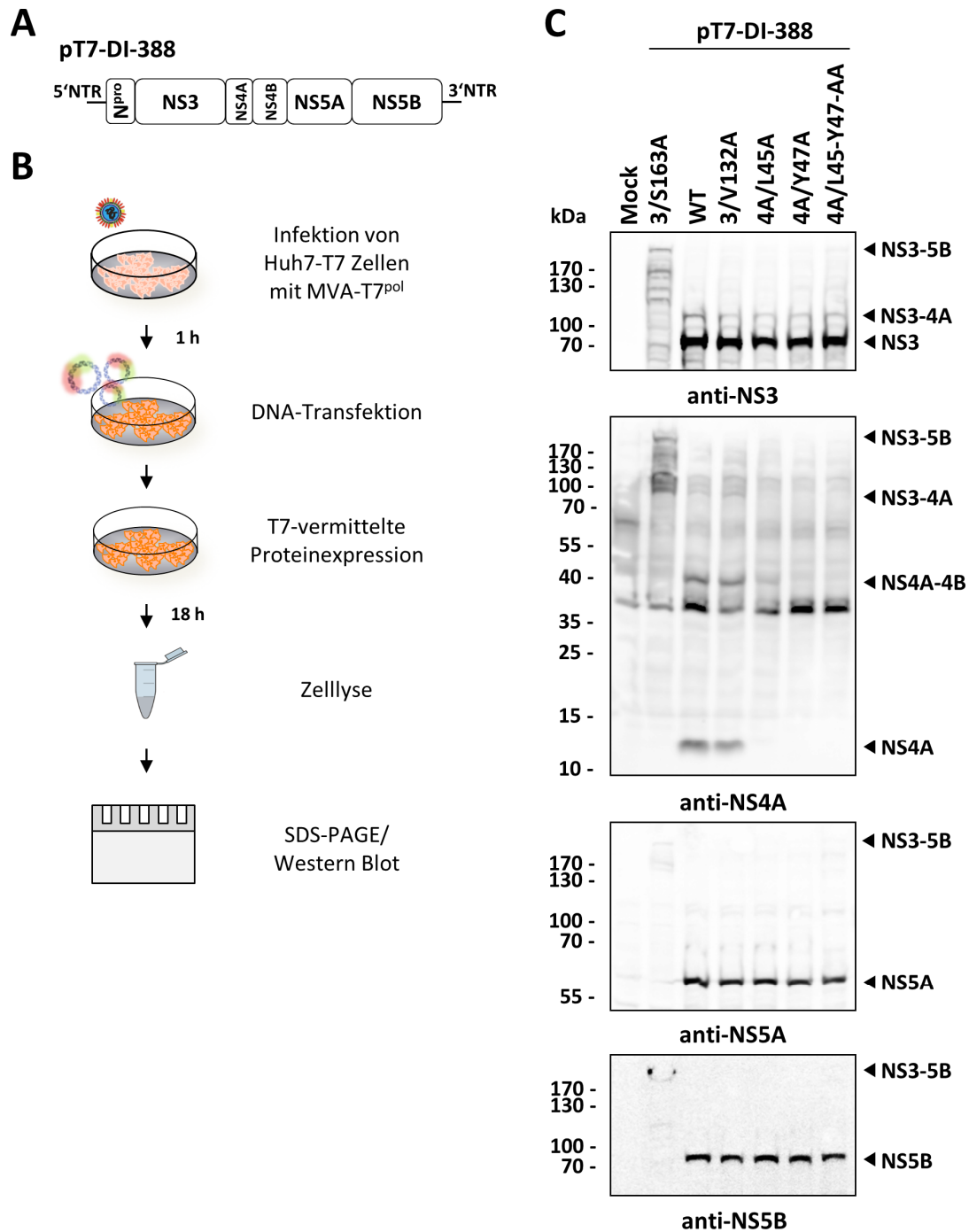


Abb. 4.4: Die Aminosäureaustausche 3/V132A, 4A/L45A, 4A/L47A und 4A/L45-Y47-AA haben keinen detektierbaren Einfluss auf die Polyproteinprozessierung. (A) Schematische Darstellung des pT7-DI-388. Das Konstrukt kodiert für die Autoprotease N^{pro} und für die pestiviralen NS-Proteine NS3-5B (minimale Replikase). Die Transkription des Konstruktes unterliegt der Kontrolle eines T7-Promotors. NTR: Nichttranslatierte Region. (B) Versuchsablauf der Untersuchung der Polyproteinprozessierung. Zunächst wurden Huh7-T7 Zellen mit Vaccinia-Virus MVA-T7^{pol} für 1 h bei 37°C infiziert. Die infizierten Zellen wurden mit pT7-DI-388 Plasmid-DNA transfiziert und für 18 h zur T7-vermittelten Proteinexpression inkubiert. Anschließend erfolgte die Zellyse und die Auftrennung der Zellysate mittels SDS-PAGE. Anschließend wurden Western Blot Analysen mittels der Primärantikörper anti-NS3, anti-NS4A, anti-NS5A und anti-NS5B durchgeführt. Als Sekundärantikörper diente anti-Maus-HRP. Die Identität der Mutationen NS3 (3/V132A) und NS4A (4A/L45A; 4A/Y47A; 4A/L45-Y47-AA) ist oberhalb des NS3 Western Blots angegeben. Die BVDV-spezifischen NS-Proteine und die detektierbaren Proteinvorläufer sind markiert (rechts). Mock: Zellen, die nicht mit DNA transfiziert wurden; 3/S163A: Mutation führt zur proteolytisch inaktiven NS3-Protease; WT: Wildtyp; kDa: Proteingrößenstandard in Kilodalton.

Die Western Blot Analysen zeigten für die Expression von pT7-DI-388 (WT) eine korrekte Prozessierung des Polyproteins, da NS3, NS4A, NS5A und NS5B in den entsprechenden Blots nachgewiesen werden konnten (Abb. 4.4 C). Zudem zeigten sich die für dieses Konstrukt typischen Vorläuferproteine NS3-4A und NS4A-4B (Klemens et al., 2015). Für das proteolytisch inaktive Derivat (3/S163A) konnte keine Polyproteinprozessierung nachgewiesen werden. Detektierbar war nur der charakteristische Polyproteinvorläufer NS3-5B mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 240 kDa. Weiterhin konnten Proteinfragmente detektiert werden, welche unspezifische Abbauprodukte des beschriebenen Proteinvorläufers darstellen (Abb. 4.4 C, anti-NS3 und anti-NS4A). Die pT7-DI-388 Derivate mit den Mutationen 3/V132A, 4A/L45A, 4A/Y47A und 4A/L45-Y47-AA, zeigten hinsichtlich der Expression und Polyproteinprozessierung keine detektierbaren Unterschiede für NS3, NS5A und NS5B im Vergleich zum Wildtyp. Bei allen untersuchten Derivaten waren die relativen Proteinmengen vergleichbar zum Wildtyp und es konnte keine Akkumulation von Proteinvorläufern nachgewiesen werden (Abb. 4.4 C).

Der Nachweis von NS4A (bzw. des NS4A-4B Vorläufers) war bei den Derivaten mit Mutationen in der NS4A Kink-Region nur sehr eingeschränkt (L45A) bzw. nicht möglich (Y47A und L45-Y47-AA). Dies ist durch die Position des Epitopes des anti-NS4A Antikörpers zu erklären, welches mit der mutierten NS4A Kink-Region überlappt (Wegener 2013, Goeppert 2014). Da sich keine NS3-4A-4B Proteinvorläufer in den anti-NS3 bzw. anti-NS4A WBs detektieren ließen, wurde davon ausgegangen, dass die Prozessierung der NS3-4A bzw. NS4A-4B Spaltstelle für die pT7-DI-388 Derivate 4A/L45A, 4A/Y47A und 4A/L45-Y47-AA effizient erfolgte (Abb. 4.4 C). Im Einklang mit früheren Studien konnte für die Mutante 3/V132A die korrekte Prozessierung des NS3-5B Polyproteins nachgewiesen werden (Klemens et al., 2015).

Dadurch, dass die Mutationen L45A, Y47A und deren Kombination L45-Y47-AA, mit der Bindung des NS4A-Antikörpers interferierten, konnte mittels Western Blot Analyse keine Aussage über die NS4A-4B Prozessierung gemacht werden. Für die Ausbildung eines voll funktionsfähigen NS3/4A Proteasekomplexes ist die korrekte und effiziente Einlagerung des NS4A Kofaktors essentiell. Um die stabile Einlagerung des Kofaktors NS4A in die NS3 Proteasedomäne experimentell nachzuweisen, wurde in den nachfolgenden Versuchen die Ko-Immünpräzipitation von radioaktiv-markierten NS3/4A-Komplexen durchgeführt (Abb. 4.5). Hierbei wird ausgenutzt, dass der Kofaktor NS4A bei erfolgreicher Einlagerung in die NS3 Proteasedomäne durch Immunpräzipitation mithilfe von anti-NS3 ko-präzipitiert werden kann (Tautz et al., 2000). Über diesen experimentellen Ansatz lässt sich somit eine Aussage darüber treffen, ob sich NS3 und NS4A korrekt zusammenlagern oder die Mutationen an der NS3/4A-Kink Interaktionsfläche einen negativen Einfluss auf diese Komplexbildung haben. Für diese Untersuchungen wurden die pT7-DI-388 Konstrukte im Huh7-T7/MVA-T7^{pool} System wie oben

beschrieben exprimiert. Nach 18 h T7-vermittelter Expression wurden die Zellen zunächst für 30 min mit Methionin/Cystein-freiem Medium inkubiert, um die Neusynthese von Proteinen zu unterbrechen. Anschließend wurde durch die Zugabe von 70 μCi ^{35}S -Methionin/ ^{35}S -Cystein (Hartmann-Label) die Proteine für 2 h radioaktiv markiert (Abb. 4.5 A). Anschließend erfolgte die Ko-Immünpräzipitation der NS3/4A-Komplexe mittels anti-NS3 Antikörper, gefolgt von der Auftrennung der präzipitierten Proteine mittels SDS PAGE und die sich daran anschließende Autoradiographie (Abb. 4.5 A).

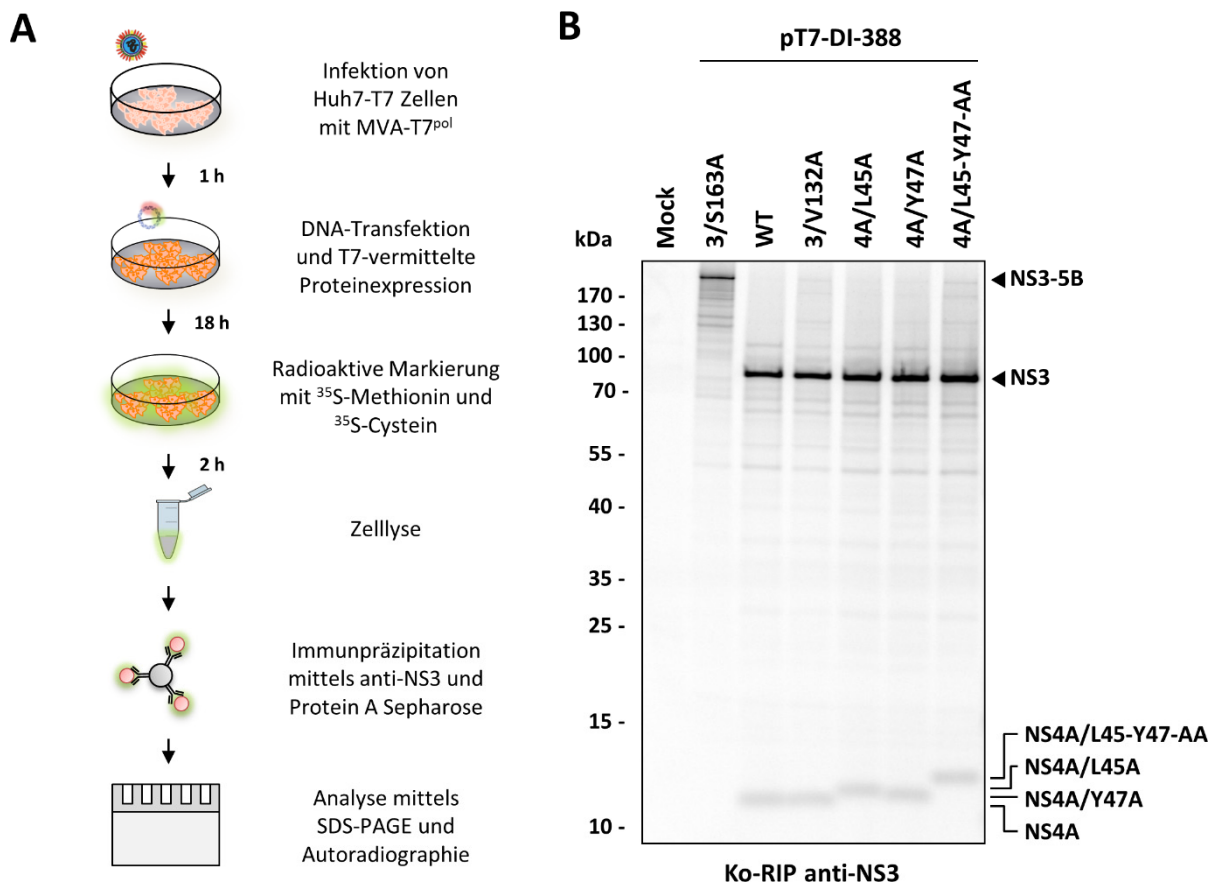


Abb. 4.5: Mutationen an der NS3/4A-Kink Interaktionsfläche haben keinen detektierbaren Einfluss auf die Einlagerung des NS4A Kofaktors in die Proteasedomäne des NS3/4A-Komplexes. (A) Schematischer Versuchsablauf. Die pT7-DI-Derivate wurden mithilfe des Huh7-T7/MVA-T7^{pol} System exprimiert. Nach 18 h Inkubationszeit erfolgte die radioaktive Markierung der Proteine mit 70 μCi ^{35}S -Methionin/ ^{35}S -Cystein für weitere 2 h. Nach der Zellyse erfolgte die Ko-Radioimmunpräzipitation mittels anti-NS3. Die präzipitierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE (10% Acrylamid) und Autoradiographie analysiert. (B) Autoradiographie eines repräsentativen NS3 Ko-RIP Experimentes (Ko-RIP anti-NS3). Die Identität der analysierten NS3/4A-Komplexe 3/V132A, 4A/L45A, 4A/Y47A und 4A/L45-Y47-AA ist gekennzeichnet. Die Positionen von NS3 und NS4A sowie des NS3-5B Vorläuferproteins sind rechts markiert. Mock: Zellen, die nicht mit DNA transfiziert wurden; 3/S163A: Mutation führt zur proteolytisch inaktiven NS3-Protease; WT: Wildtyp; kDa: Proteingrößenstandard in Kilodalton.

Die Auswertung des Ko-Immünpräzipitationsexperiments zeigte, dass für jede pT7-DI-388 Variante mit dem NS3 der essentielle Kofaktor NS4A ko-präzipitiert werden konnte (Abb. 4.5 B). Im Gegensatz dazu konnte bei der Ko-IP der Variante 3/S163A nur der Polyproteinvorläufer bei ca. 240 kDa nachgewiesen werden. Der Vergleich zum Wildtyp ergab für die Derivate mit den Mutationen in der NS3/4A-Kink

Interaktionsfläche (3/V132A, 4A/L45A, 4A/Y47A, 4A/L45-Y47-AA) keine detektierbaren Unterschiede im Verhältnis von NS3 und NS4A in den präzipitierten NS3/4A Komplexen (Abb. 4.5 B, vgl. WT mit 3/V132A, 4A/L45A, 4A/Y47A, 4A/L45-Y47-AA). In der Auswertung der Autoradiographie fiel beim Vergleich des Wildtyps und der 3/V132A Variante mit den NS4A-Derivaten L45A, Y47A und L45-Y47-AA das veränderte Laufverhalten der ko-präzipitierten NS4A Proteine im Acrylamidgel auf. Diese Beobachtung lässt sich mit den eingeführten Alaninmutationen in der NS4A Kink-Region erklären. Weiterhin konnte für die verschiedenen Derivate keine detektierbare Präzipitation des NS3-4A Vorläufers festgestellt werden, was darauf schließen lässt, dass die NS3-4A Prozessierung für alle Derivate effizient ablief.

Zusammengefasst weisen die durchgeführten Untersuchungen zur Polyproteinprozessierung und zur NS3/4A-Komplexbildung darauf hin, dass das Einbringen von Mutationen in die NS3/4A-Kink Interaktionsfläche keinen negativen Einfluss auf die Proteasefunktion der entsprechenden NS3/4A-Komplexe hat.

4.4 Die Abschwächung der NS3/4A-Kink Interaktion ist kritisch für die RNA-Replikation

In den bisherigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass Mutationen an der NS3/4A-Kink Interaktionsfläche eine Abschwächung dieser Oberflächeninteraktion bewirken, jedoch keinen detektierbaren Einfluss auf die Polyproteinprozessierung haben. Der NS3/4A Komplex hat, neben seiner Funktion in der pestiviralen Polyproteinprozessierung, eine essentielle Bedeutung für die RNA-Replikation, da er ein Bestandteil der viralen Replikase (NS3-NS5B) ist und mit seiner Helikase- und NTPase-Aktivität zur RNA-Replikation beiträgt (Behrens et al., 1998; Grassmann et al., 1999). Veränderungen innerhalb des NS3/4A Komplexes können deshalb zur Beeinträchtigung der RNA-Replikation führen (Klemens et al., 2015). Deshalb wurde untersucht, ob die beschriebenen Mutationen an der NS3/4A-Kink Interaktionsfläche Auswirkungen auf die RNA-Replikationsfähigkeit der entsprechenden Replikon-Derivate haben.

Zur qualitativen Analyse der RNA-Replikation konnten die pT7-DI-388 Derivate (3/V132A, 4A/L45A, 4A/Y47A, 4A/L45-Y47-AA) genutzt werden, da die *in vitro* transkribierte RNA dieser Replikonkonstrukte nach dem Einbringen in MDBK-Zellen prinzipiell zur autonomen RNA-Replikation befähigt sind (Abb. 4.6 A). Zusätzlich wurde das pT7-DI-388 Derivat (NS5B/GAA) mitgeführt, welches aufgrund von zwei Mutationen im GDD-Motiv der RNA-abhängigen RNA Polymerase NS5B (RdRp) nicht zur RNA-Replikation befähigt ist (Behrens et al., 1998; Wang et al., 2007). Als Referenz-RNA, die zu einer effizienten RNA-Replikation befähigt ist, wurde die DI-388 WT RNA benutzt. Für die Untersuchung der RNA-Replikation wurden 1 µg *in vitro* transkribierter DI-388 RNA des Wildtyps oder der Derivate in

MDBK-Zellen elektroporiert. 24 h nach der Elektroporation erfolgte der indirekte Nachweis der RNA-Replikationsfähigkeit durch die Detektion von NS3-positiven Zellen mittels Immunfluoreszenzanalyse (Abb. 4.6 B). Die Analysen der einzelnen Replikonderivate ergaben deutliche Unterschiede in ihrer RNA-Replikationsfähigkeit im Vergleich zum Wildtyp Replikon (Abb. 4.6 C).

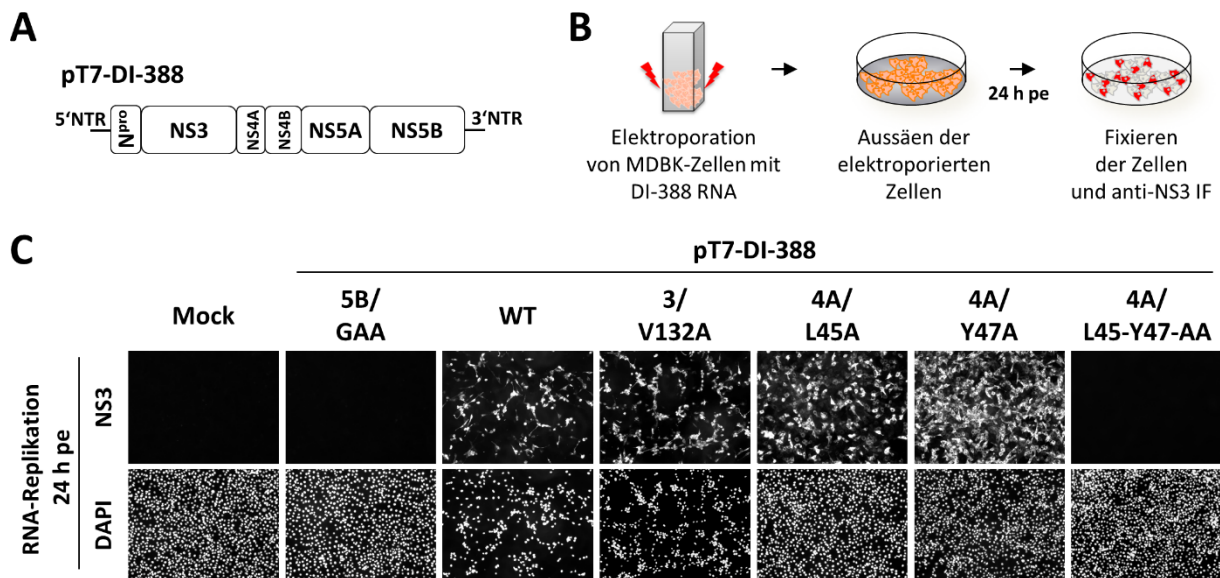


Abb. 4.6: Eine Abschwächung der Oberflächeninteraktion zwischen der NS3 Proteasedomäne und der NS4A Kink-Region beeinflusst die RNA-Replikationsfähigkeit. (A) Schematische Darstellung des pT7-DI-388. Das Konstrukt kodiert für die Autoprotease N^{pro} und für die pestiviralen NS-Proteine NS3-5B (minimale Replikase). Die Transkription des Konstruktes unterliegt der Kontrolle eines T7-Promotors. NTR: Nichttranslatierte Region. (B) Versuchsablauf zur qualitativen Untersuchung der RNA-Replikation. (C) Die linearisierte pT7-DI-388 Plasmid-DNA kann, wie in 3.2.2.1. beschrieben, mittels T7-Polymerase zur *in vitro* Transkription genutzt werden. 1 µg der jeweiligen Replikon-RNA (WT oder Derivate) wurde in MDBK-Zellen elektroporiert und die Zellen anschließend bei 37°C inkubiert. 24 h nach der Elektroporation (engl. *post electroporation*, pe) wurden die Zellen fixiert und die RNA-Replikation indirekt mittels NS3-spezifischer Immunfluoreszenzanalyse (anti-NS3 IF) untersucht. Die Zellkerne wurden mittels DAPI nachgewiesen. Die jeweiligen Mutationen in NS3 (V132A) und NS4A (L45A, Y47A, L45-Y47-AA) sind gekennzeichnet. WT: Wildtyp; 5B/GAA: replikationsinkompetentes Replikon-Derivat mit Mutation 5B/GAA im NS5B; Mock: Zellen, die nicht mit RNA elektroporiert wurden.

Die Analyse der mit DI-388 WT und DI-388 5B/GAA Replikon RNA elektroporierten Zellen ergab die erwarteten Ergebnisse (Abb. 4.6 C). 24h pe waren für die mit WT DI-388 RNA elektroporierten Zellen NS3-positiv und somit RNA-Replikation detektierbar, wohingegen für MDBK-Zellen, die mit DI-388 5B/GAA Replikon RNA elektroporiert wurden, keine NS3-positiven Zellen und somit keine RNA-Replikation nachweisbar war. Weiterhin zeigte die NS3-spezifische Immunfluoreszenzanalyse nach 24h pe, dass die DI-388 Replikonderivate 3/V132A, 4A/L45A und 4A/Y47A replikationskompetent sind. Im Gegensatz dazu konnte für die Doppelmutante 4A/L45-Y47-AA keine RNA-Replikation durch NS3-spezifische IF festgestellt werden (Abb. 4.6 C). Es ist bekannt, dass die effiziente, nicht regulierte Freisetzung von NS3 während der viralen RNA-Replikation von DI-388 Replikon RNA zur Ausbildung eines deutlichen zytopathischen Effekts (ZPE) in den elektroporierten Zellen führt, wodurch diese sich

morphologisch verändern und im weiteren Verlauf absterben (Grummer et al., 2002a; Isken et al., 2014; Klemens et al., 2015). Dies lässt sich besonders gut bei dem Vergleich von MDBK-Zellen, die mit DI-388 WT Replikon RNA elektroporiert worden sind und Zellen, die nicht mit RNA elektroporiert worden sind (Mock), demonstrieren (Abb. 4.6 C – vgl. DAPI von WT und Mock). Somit ist das Ausmaß an ZPE 24 h pe ein guter Indikator für die Effizienz der RNA-Replikation von pestiviraler Replikon RNA. Ein sehr starker ZPE war nach 24 h bei MDBK-Zellen zu beobachten, die mit DI-388 RNA (WT) und dem 3/V132A DI-388 Replikonderivat elektroporiert worden waren (Abb. 4.6 C; vgl. DAPI von WT und 3/V132A mit Mock). Dies war in Zellen, in die DI-388 4A/L45A bzw. 4A/Y47A Replikon RNA eingebracht worden war, nicht in vergleichbarem Ausmaß der Fall (Abb. 4.6 C; vgl. DAPI von WT und 3/V132A mit DAPI von 4A/L45A und 4A/Y47A). Aus diesen Beobachtungen konnte geschlossen werden, dass das Einführen der NS3 Mutation 3/V132A keinen starken negativen Einfluss auf die RNA-Replikationsfähigkeit des entsprechenden Replikonderivates hatte, während Mutationen in der NS4A Kink-Region zu einer deutlichen Abschwächung der RNA-Replikationsfähigkeit führten.

Die qualitativen Untersuchungen der RNA-Replikationsfähigkeit der einzelnen Replikonderivate zeigten, dass Mutationen an der NS3/4A-Kink Interaktionsfläche einen unterschiedlichen Einfluss auf die RNA-Replikation haben können.

Um die RNA-Replikation quantifizieren zu können, wurde das bicistronische Reporterreplikon Bici RLuc IRES-Ubi-NS3-3' generiert (Abb. 4.7 A), welches auf Bici RLuc IRES-NS3-3' basiert (Isken et al., 2014). Im ersten ORF kodiert Bici RLuc IRES-Ubi-NS3-3' für die Autoprotease N^{pro} und das Reporterogen *Renilla* Luciferase (zur direkten Bestimmung der RNA-Replikationseffizienz). Im zweiten ORF, dessen Translationinitiation über eine EMCV-IRES vermittelt wird, sind die Proteine der minimalen Replikase (NS3-NS5B) kodiert. N-terminal von NS3 wurde Ubiquitin eingeführt, um die Generierung des authentischen N-Terminus von NS3 zu gewährleisten. Flankiert sind die beiden ORFs von den authentischen BVDV-1 5'- und 3'NTR. Die *in vitro* transkribierte Bici RLuc IRES-Ubi-NS3-3' RNA ist nach Elektroporation in MDBK-Zellen zur autonomen RNA-Replikation befähigt. Die Bestimmung der RNA-Replikationseffizienz kann durch den Nachweis der Luciferase-Aktivität zu verschiedenen Zeitpunkten erfolgen, da die Menge von translatierter *Renilla*-Luciferase proportional zur RNA-Replikation des Replikons ist (Abb. 4.7 B).

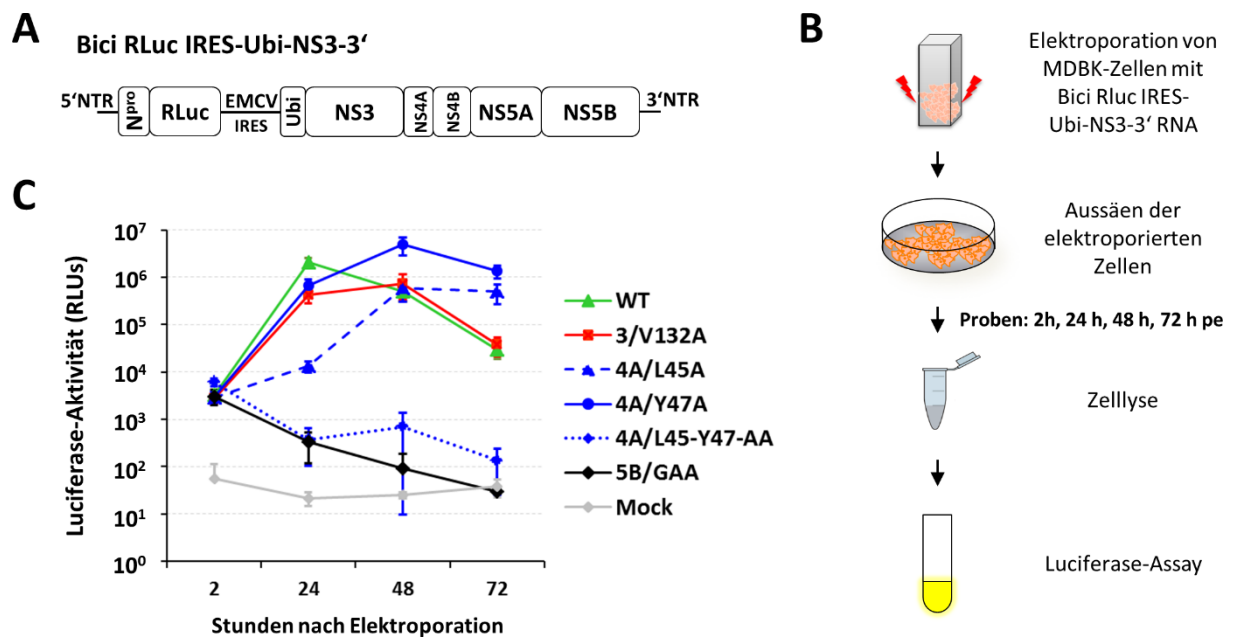


Abb. 4.7: Mutationen an der NS3/4A-Kink Interaktionsfläche beeinflussen die RNA-Replikationseffizienz in unterschiedlichem Ausmaß. (A) Schematische Darstellung der bicistronischen Replikons Bici RLuc IRES-Ubi-NS3-3'. Im ersten ORF kodiert diese Replikon RNA für die virale Autoprotease N^{pro} und die *Renilla*-Luciferase (RLuc). Im zweiten ORF sind die Proteine der viralen Replikase (NS3-5B) enthalten. Der authentische N-Terminus von NS3 wird durch Ubiquitin (Ubi) sichergestellt. NTR: Nichttranslatierte Region. (B) Skizzierung des Versuchsablaufs. MDBK-Zellen wurden mit 1 µg *in vitro* transkribierter Replikon RNA elektroporiert und inkubiert. 2 h, 24 h, 48 h und 72 h nach der RNA Elektroporation (pe) wurden die Zellen geerntet. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen und die Bestimmung der Luciferase-Aktivitäten mittels Luciferase-Assay. (C) Quantitative Auswertung der viralen RNA-Replikation. Dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen Luciferase-Aktivitäten für die entsprechenden Replikon RNA's mit den jeweiligen Standardabweichungen (n=4). Die entsprechenden Mutationen in NS3 (V132A) und NS4A (L45A, Y47A, L45-Y47-AA) sind eingezeichnet. WT: Wildtyp; 5B/GAA: replikationsinkompetentes Replikon-Derivat mit Mutation 5B/GAA im NS5B; Mock: Zellen, die nicht mit RNA elektroporiert wurden; RLU: *relative light unit*.

Um herauszufinden, wie sich Mutationen innerhalb der NS3/4A-Kink Grenzfläche auf die RNA-Replikation auswirken, wurden die Bici RLuc IRES-Ubi-NS3-3'-Derivate 3/V132A, 4A/L45A, 4A/Y47A und L45-Y47-AA hergestellt und bzgl. ihrer Replikationsfähigkeit analysiert (Abb. 4.7). Zur Abschätzung der Replikationsfähigkeit wurden das Wildtyp Replikon Bici RLuc IRES-Ubi-NS3-3' und dessen replikationsinkompetentes Derivat NS5B/GAA mitgeführt. Nach der Elektroporation der Wildtyp Bici RLuc IRES-Ubi-NS3-3' Replikon RNA bzw. der entsprechenden Derivate in MDBK-Zellen wurde die Luciferase-Aktivität an den Zeitpunkten 2 h, 24 h, 48 h und 72 h pe bestimmt. 2 h pe konnte für alle analysierten Replikon RNAs vergleichbare Luciferase-Aktivitäten von ca. 3.0×10^3 RLU detektiert werden (Abb. 4.7 C, vgl. 2 h pe). Dieses Ergebnis zeigte vergleichbare Elektroporationseffizienzen für die analysierte Replikon RNAs an, da an diesem Zeitpunkt v.a. die initial eingebrachte RNA translatiert wird. Für die Wildtyp Replikon RNA konnte ein typischer Replikationsverlauf mit einem Maximum von $2,1 \times 10^6$ RLU Luciferase-Aktivität nach 24 h pe detektiert werden (Abb. 4.7 C, WT 24 h pe). Zu späteren Zeitpunkten (48 h pe und 72 h pe) sank die Luciferaseaktivität für das Wildtyp Replikon deutlich auf

$3,0 \times 10^4$ RLU_s aufgrund des zytopathischen Effekts ab (Isken et al., 2014; Klemens et al., 2015). Im Vergleich zum WT zeigte das 3/V132A Derivat eine leicht verminderte RNA-Replikationseffizienz von $4,3 \times 10^5$ RLU_s nach 24 h (pe). Nach 48 h pe und 72 h pe waren die Luciferase-Werte von WT und 3/V132A vergleichbar (Abb. 4.7 C, vgl. WT mit 3/V132A an 48 h pe und 72 h pe). Im Gegensatz dazu waren die Derivate, die Mutationen in der NS4A Kink-Region aufwiesen, stärker in ihrer RNA-Replikationsfähigkeit beeinträchtigt. Das Replikonderivat 4A/Y47A erreichte sein Maximum an gemessener Luciferaseaktivität erst nach 48 h pe, gefolgt von dessen Abnahme (Abb. 4.7 C). Noch stärker in der RNA-Replikation beeinträchtigt zeigte sich das Replikon mit der Mutation 4A/L45A, da dieses Replikonderivat sein Maximum an Luciferaseaktivität von ca. $6,0 \times 10^5$ RLU_s ebenfalls erst nach 48 h erreichte, ohne danach den charakteristischen Abfall zu zeigen (Abb. 4.7 C, vgl. 48 h pe mit 72 h pe von 4A/L45A). Für das Bici RLuc IRES-Ubi-NS3-3' Derivat mit der Doppelmutation L45-Y47-AA im NS4A konnte keine RNA-Replikation nachgewiesen werden, was im Einklang mit den Untersuchungen im pT7-DI-388 Kontext war (vgl. 4A/L45-Y47-AA in Abb. 4.6 C mit Abb. 4.7 C). In den quantitativen Analysen verhielt sich dieses Replikon vergleichbar zur Negativkontrolle (5B/GAA) (Abb. 4.7 C).

Die hier dargestellten Untersuchungen zur RNA-Replikation haben gezeigt, dass sich Mutationen in der NS3/4A-Kink Interaktionsfläche kritisch auf die RNA-Replikation auswirken können. Es wurde deutlich, dass der Einfluss auf die RNA-Replikation in Abhängigkeit der betrachteten Mutation unterschiedlich stark ausfällt. Interessanterweise haben die Mutationen, die im Vergleich zur WT-Situation im TEV^{pro}-Spaltungsassay nur moderat erhöhte Spaltungsraten aufwiesen, nur einen geringen Einfluss auf die RNA-Replikation (vgl. Abb. 4.3 mit Abb. 4.6 und Abb. 4.7). Im Gegensatz dazu war die NS4A Doppelmutante L45-Y47-AA, welche im TEV^{pro}-Spaltungsassay die stärkste Abschwächung der NS3/4A-Kink Interaktion aufwies, replikationsinkompetent. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine relativ kompakte NS3/4A-Komplexformation durch die NS3/4A-Kink Oberflächeninteraktion eine strukturelle Voraussetzung für eine funktionelle Replikase darstellt.

4.5 In der NS2-3-unabhängigen Virionmorphogenese kann die Mutation 3/V132A durch die Mutationen L45A oder Y47A in der NS4A Kink-Region funktionell ersetzt werden

Für eine effiziente NS2-3-unabhängige Virionmorphogenese ist der Aminosäureaustausch E440V in der NS2 Proteasedomäne sowie die Mutation V132A in der NS3 Proteasedomäne notwendig (Klemens et al., 2015). Die Struktur-Funktionsuntersuchungen der vorliegenden Arbeit implizieren, dass der Austausch 3/V132A die Abschwächung der Oberflächeninteraktion zwischen der NS3 Proteasedomäne und der NS4A Kink-Region bewirkt (Abb. 4.1 und Abb. 4.3). Es ist somit denkbar, dass nicht die Identität der Mutation 3/V132A, sondern die Reduktion der Interaktion an der NS3/4A-Kink Interaktionsfläche die strukturelle Grundlage für die NS2-3-unabhängige Virionmorphogenese darstellt. Da die Einzelmutationen L45A und Y47A in der NS4A Kink-Region im Vergleich zum WT auch eine moderate Abschwächung der NS3/4A-Kink Interaktion bewirken, die in der RNA-Replikation toleriert wird, sollte untersucht werden, ob diese Mutationen in der Lage sind, 3/V132A im Kontext der NS2-3-unabhängige Virionmorphogenese funktionell zu ersetzen (Abb. 4.8). Diese Untersuchungen wurden mit dem BVDV-1 NCP7 NS2-Ubi-NS3 Derivat durchgeführt, in dem NS2 und NS3 mittels Ubiquitininsertion voneinander getrennt sind (Abb. 4.8 A). In diesem NCP7 NS2-Ubi-NS3 Kontext konnte gezeigt werden, dass die NS2-3-unabhängige Virionmorphogenese besonders effizient ist, wenn das virale Genom die Mutationen 2/E440V und 3/V132A aufweist (Klemens et al., 2015). In Analogie wurden die Derivate NCP7 NS2-Ubi-NS3 (2/E440V + 4A/L45A) bzw. (2/E440V + 4A/Y47A) generiert. Als Referenzen wurden in den Experimenten NCP7 (WT), das replikationsinkompetente Derivat NCP7 (5B/GAA) sowie NCP7 NS2-Ubi-NS3 (ist nicht in der Lage NS2-3-unabhängig Virionen zu generieren) als auch das Derivat mit den Austauschen 2/E440V und 3/V132A, welches die NS2-3-unabhängig Virionmorphogenese unterstützt, mitgeführt.

Um den Beitrag der abgeschwächten NS3/4A-Kink Interaktion für die NS2-3-unabhängige Virionmorphogenese zu demonstrieren wurde das NCP7 NS2-Ubi-NS3 (2/E440V) Derivat in die Analyse miteinbezogen, welches nur die Mutation 2/E440V aufweist. Für die Untersuchung der RNA-Replikation und Virionmorphogenese der beschriebenen NCP7 NS2-Ubi-NS3 Derivate wurden MDBK-Zellen mit 1 µg *in vitro* transkribierter RNA dieser Derivate elektroporiert. 24 h nach Elektroporation erfolgte der Nachweis der RNA-Replikationsfähigkeit dieser viralen Genome indirekt mittels anti-NS3 IF (Abb. 4.10 B – oben: RNA-Replikation). In diesen Analysen konnte für alle untersuchten viralen RNA's, mit Ausnahme der Negativkontrolle (5B/GAA), virales NS3 in den elektroporierten Zellen nachgewiesen werden was die RNA-Replikationsfähigkeit der entsprechenden NCP7 NS2-Ubi-NS3 Derivate verdeutlicht. Diese Ergebnisse bestätigen die Resultate der RNA-Replikationsexperimente im Replikonkontext (Abb. 4.6 und 4.7) als auch die Ergebnisse von Klemens *et al.* die bereits mit dem NCP7 NS2-Ubi-NS3 (2/E440V + 3/V132A) Derivat erhalten wurden (Klemens et al., 2015).

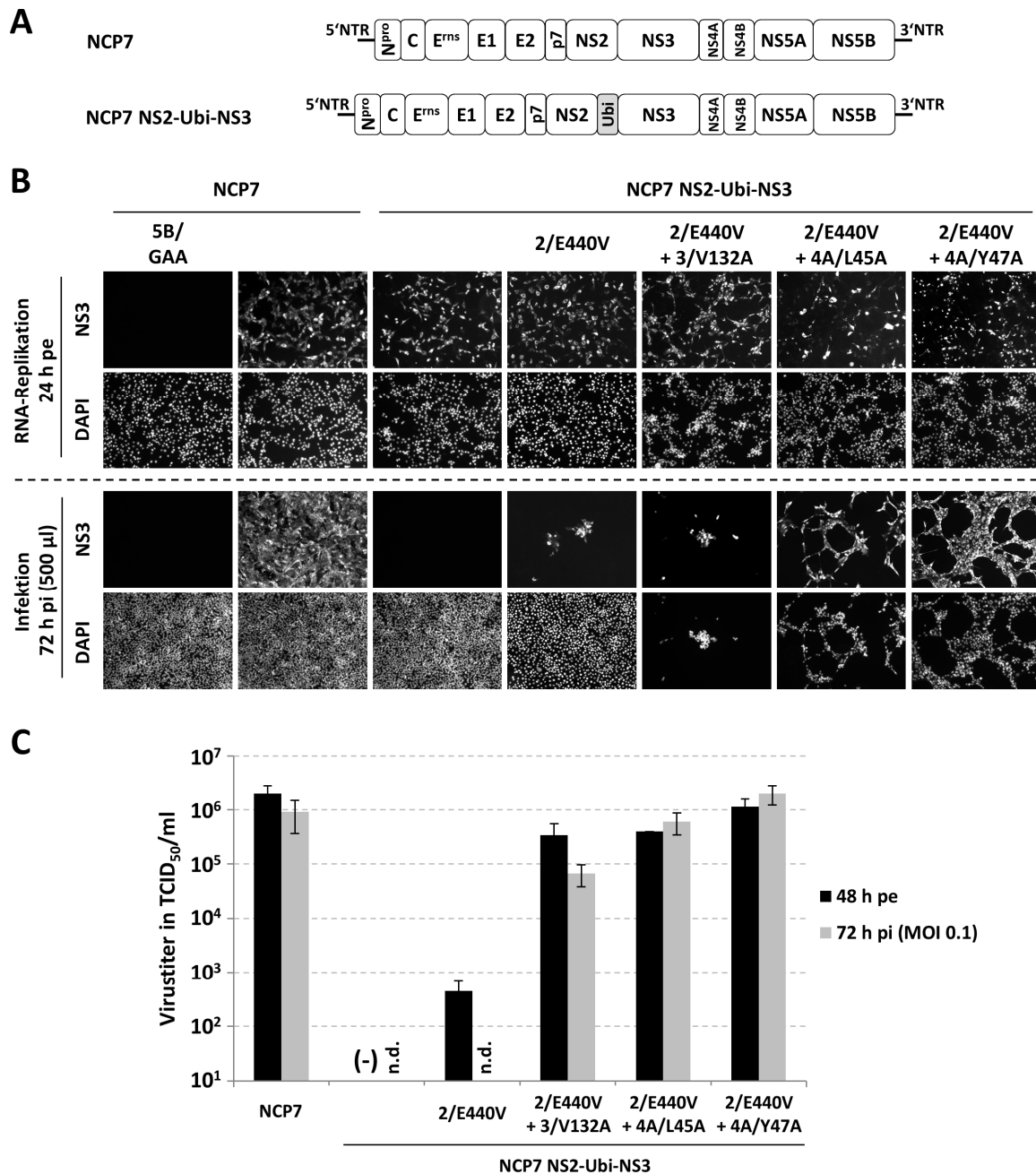


Abb. 4.8: In der NS2-3-unabhängigen Virionmorphogenese können die Aminosäureaustausche L45A oder Y47A in der NS4A Kink-Region die Mutation 3/V132A funktionell ersetzen. (A) Genomorganisation von BVDV-1 NCP7 (oben) und dem davon abgeleiteten Derivat NCP7 NS2-Ubi-NS3 mit Ubiquitininsertion (Ubi – grau) zwischen NS2 und NS3 (unten). Die Strukturproteine (C, E^{rns}, E1, E2) und NS-Proteine (N^{pro}, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) sind gekennzeichnet. NTR: Nichttranslatierte Region. (B) Auswirkung der verschiedenen NS4A Mutationen auf die virale RNA-Replikation und Virionmorphogenese. MDBK-Zellen wurden mit 1 µg *in vitro* transkribierter RNA des entsprechenden NCP7 bzw. NCP7 NS2-Ubi-NS3 elektroporiert. 24 h nach der Elektroporation erfolgte der Nachweis der RNA-Replikation indirekt mittels NS3-spezifischer IF (RNA-Replikation – oben). 48 h nach Elektroporation wurden die Zellkulturüberstände gesichert und sterilfiltriert. 500 µl dieser ZK-Überstände wurden genutzt, um naive MDBK-Zellen zu inokulieren. 72 h nach der Inokulation (engl. *post infection*, pi) erfolgte der Nachweis von infizierten Zellen mittels anti-NS3 IF (Infektion – unten). Die Zellkerne wurden mittels DAPI nachgewiesen. Die entsprechenden Mutationen in NS2 (2/E440V), NS3 (3/V132A) und NS4A (4A/L45A, 4A/Y47A) sind gekennzeichnet. 5B/GAA: replikationsinkompetentes NCP7 Derivat – Negativkontrolle. (C) Bestimmung der Virustiter. Die Bestimmung des Virustiters in TCID₅₀/ml erfolgte mit ZK-Überständen 48 h pe bzw. die durch eine definierte Infektion mit MOI 0,1 auf naiven MDBK-Zellen gewonnen wurden. Die Titration erfolgte auf naiven MDBK-Zellen, wie in 3.2.3.8 beschrieben. Der Graph zeigt die Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen (n=3). n.d.: nicht durchgeführt; (-): es wurden keine infizierten Zellen detektiert.

Zur Untersuchung des Einflusses von NS4A Mutationen auf die NS2-3-unabhängige Virionmorphogenese wurden die generierten Zellkulturüberstände 48 h pe sterilfiltriert und zur Inokulation von naiven MDBK-Zellen verwendet. 72 h nach Infektion (engl. *post infection*, pi) wurden infizierte Zellen mittels NS3-spezifischer IF nachgewiesen. Wie erwartet, waren bei der Infektion mit NCP7 nahezu alle Zellen NS3-positiv (Abb. 4.8 B – unten: Infektion). Im Gegensatz dazu konnten keine infektiösen Viruspartikel in den ZK-Überständen der Negativkontrollen 5B/GAA und NCP7 NS2-Ubi-NS3 nachgewiesen werden (Klemens et al., 2015). Wie bereits durch Klemens *et al.* gezeigt wurde, konnte sich NCP7 NS2-Ubi-NS3 (2/440V + 3/V132A) komplett in der Zellkultur ausbreiten (Klemens et al., 2015). Da NCP7 NS2-Ubi-NS3 durch die Ubiquitininsertion zwischen NS2 und NS3 eine deregulierte RNA-Replikation aufweist, kam es zu einem massiven ZPE (Abb. 4.8 B – unten: Infektion – vgl. DAPI). Alle verbliebenen Zellen waren NS3-positiv (Abb. 4.8 B – unten: Infektion). Im Gegensatz dazu konnten nur wenig NS3-positive Zellen für die NCP7 NS2-Ubi-NS3 Variante nachgewiesen werden, die im NS2 die Mutation E440V kodierte. Erwartungsgemäß konnte für dieses Derivat kein ZPE nachgewiesen werden (Klemens et al., 2015). Der Vergleich dieser beiden NCP7 NS2-Ubi-NS3 Derivate verdeutlicht abermals die essentielle Bedeutung einer veränderten NS3/4A-Kink Interaktion für die NS2-3-unabhängige Virionmorphogenese. Wurde die NS2 Mutation E440V hingegen mit den beiden NS4A-Kink Mutationen im NCP7 NS2-Ubi-NS3 Kontext kombiniert, konnte die Fähigkeit zur NS2-3-unabhängigen Virionmorphogenese wiederhergestellt werden. Infektionen mit den Virusderivaten NCP7 NS2-Ubi-NS3 (2/E440V + 4A/L45A) oder NCP7 NS2-Ubi-NS3 (2/E440V + 4A/Y47A) resultierten in der nahezu vollständigen Infektion der MDBK-Zellen (Abb. 4.8 B – unten: Infektion). Dies lässt darauf schließen, dass sich diese beiden Varianten hinsichtlich der NS2-3-unabhängigen Virionmorphogenese analog zum NCP7 NS2-Ubi-NS3 (2/E440V + 3/V132A) Derivat verhalten.

Um die verschiedenen Virusderivate hinsichtlich ihrer Effizienz der Virionmorphogenese zu vergleichen, wurden die jeweiligen Virustiter 48 h nach Elektroporation in TCID₅₀/ml bestimmt (Abb. 4.8 C – 48 h pe). Zusätzlich wurde für alle Viren bzw. Virusderivate, die einen entsprechend hohen Virustiter 48 h pe aufwiesen, eine definierte Infektion mit MOI 0,1 durchgeführt, um Unterschiede im Virustiter durch verschiedenen Elektroporationseffizienzen auszuschließen (Abb. 4.8 C – 72 h pi MOI 0,1). Die Titerbestimmung für NCP7 WT ergab Titer von ca. $1,2 \times 10^6$ TCID₅₀/ml (48 h pe) und ca. $9,2 \times 10^5$ TCID₅₀/ml, nach definierter Infektion mit MOI 0,1. Erwartungsgemäß konnte für NCP7 NS2-Ubi-NS3 kein Virustiter bestimmt werden (Klemens et al., 2015) (Abb. 4.8 C – 48 h pe). Während für das NCP7 NS2-Ubi-NS3 (2/E440V) Derivat nur ein geringer Virustiter von ca. $4,5 \times 10^2$ TCID₅₀/ml nach 48 h pe ermittelt wurde, erreichten die Derivate NCP7 NS2-Ubi-NS3 (2/E440V + 3/V132A), NCP7 NS2-Ubi-NS3 (2/E440V + 4A/L45A) und NCP7 NS2-Ubi-NS3 (2/E440V + 4A/Y47A) erhöhte Virustiter 48 h pe (3/V132A: $3,4 \times 10^5$ TCID₅₀/ml; 4A/L45A: $4,0 \times 10^5$ TCID₅₀/ml; 4A/Y47A: $1,1 \times 10^6$ TCID₅₀/ml) (Abb. 4.8 C – 48 h pe) bzw. 72 h nach Infektion mit MOI 0,1 auf (3/V132A: $6,7 \times 10^4$ TCID₅₀/ml; 4A/L45A: $6,0 \times 10^5$

TCID₅₀/ml; 4A/Y47A: 2.0×10^6 TCID₅₀/ml) (Abb. 4.8 C – 72 h pi MOI 0,1). Die Untersuchungen zur NS2-3-unabhängigen Virionmorphogenese machten deutlich, dass die Mutation 3/V132A durch die Aminosäureaustausche L45A bzw. Y47A in der NS4A Kink-Region funktionell ersetzt werden kann.

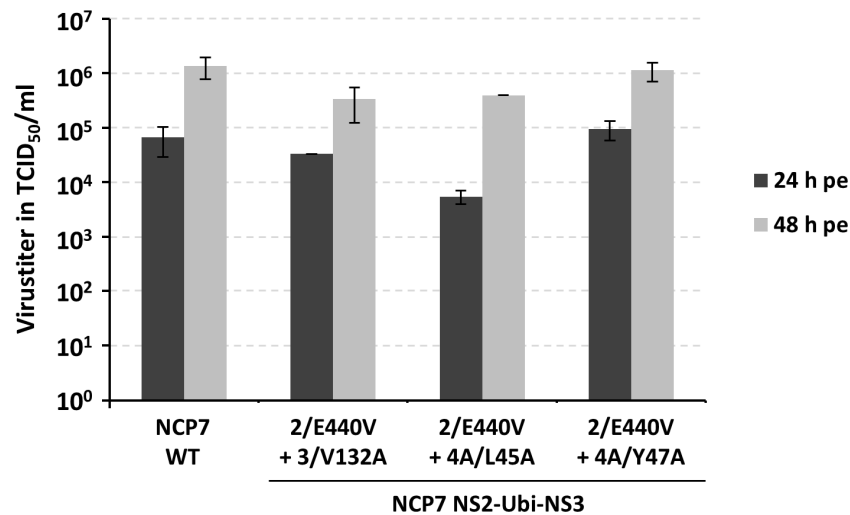


Abb. 4.9: Zeitliche Entwicklung des Virustiters verschiedener NCP7-Virusderivate nach Elektroporation. MDBK-Zellen wurden mit 1 µg *in vitro* transkribierter RNA des entsprechenden Virus bzw. Virusderivats elektroporiert. 24 h und 48 h nach Elektroporation wurden die Zellkulturüberstände gesichert und sterilfiltriert. Anschließend erfolgte die Virustiter Bestimmung in TCID₅₀/ml auf naiven MDBK-Zellen. Der Graph zeigt die Mittelwerte mit den Standardabweichungen (n=3). Die entsprechenden Mutationen in NS2 (2/E440V), NS3 (3/V132A) und NS4A (4A/L45A, 4A/Y47A) sind gekennzeichnet. WT: Wildtyp.

Die quantitativen Untersuchungen zur Replikationsfähigkeit zeigten eine deutlich verlangsamte RNA-Replikation für das 4A/L45A Derivat im Vergleich zum WT, 4A/Y47A und 3/V132A (Abb. 4.7), welche nach 48 h weitestgehend ausgeglichen waren. Um einen detaillierteren Einblick in die zeitliche Entwicklung des Virustiters zu bekommen, wurde dieser nach 24 h pe und 48 h pe bestimmt (Abb. 4.9). Die ermittelten Virustiter nach 24 h pe spiegelten sehr gut die Replikationseffizienz der einzelnen Derivate wider. So wurden für NCP7 WT und die Virusderivate NCP7 NS2-Ubi-NS3 (2/E440V + 3/V132A) sowie die NCP7 NS2-Ubi-NS3 (2/E440V + 4A/Y47A) Variante bereits nach 24 h pe ein hoher Titer im Bereich von $3,3 \times 10^4$ - $9,6 \times 10^4$ TCID₅₀/ml ermittelt, wohingegen die NCP7 NS2-Ubi-NS3 (2/E440V + 4A/L45A) Variante geringere Virustiter ausbildete (24 h pe: $5,5 \times 10^3$ TCID₅₀/ml) (Abb. 4.9 – 24 h pe). Die ermittelten Virustiter nach 48 h pe zeigten einen weiteren Anstieg der infektiösen Viruspartikel im Vergleich zu 24 h pe. Wie in den vorangegangenen Versuchen war zu diesem Zeitpunkt kein Unterschied zwischen 3/V132A und 4A/L45A detektierbar. Beide Derivate erreichten vergleichbare Titer von ca. $3,5 \times 10^5$ TCID₅₀/ml. Im Vergleich dazu waren die Virustiter von NCP7 WT bzw. des NCP7 NS2-Ubi-NS3 (2/E440V + 4A/Y47A) erhöht (ca. $1,3 \times 10^6$ TCID₅₀/ml) (Abb. 4.9 – 48 h pe). An dieser Stelle lässt sich zusammenfassen, dass alle getesteten NCP7 NS2-Ubi-NS3 Derivate in der Lage waren hohe

Virustiter nach 48 h pe zu generieren. Die Effizienz der Partikelbildung unterscheidet sich jedoch zu Zeitpunkten nach Elektroporation.

In der Studie von Klemens *et al.* konnte die NS2-3-unabhängige Virionmorphogenese auch auf ein bicistronisches Virusgenom übertragen werden, in welchem NS2 und NS3 durch eine EMCV-IRES getrennt waren. Wie schon im NCP7 NS2-Ubi-NS3 Kontext waren die Austausche 2/E440V und 3/V132A auch im NCP7 NS2-IRES-NS3 Kontext von essentieller Bedeutung für die Bildung infektiöser Virionen. Im Gegensatz zum NCP7 NS2-Ubi-NS3 mussten jedoch im NCP7 NS2-IRES-NS3 Kontext zusätzliche Mutationen in E2, NS2 und NS5B vorhanden sein, um NS2-3-unabhängig effizient Virionen auszubilden (Klemens et al., 2015). Diese Unterschiede sind wahrscheinlich z.T. Adaptationen aufgrund der Präsenz der EMCV-IRES und der damit einhergehenden Veränderung der NS3 Generierung (NS2-Ubi-NS3-5B Polyprotein vs. NS3-5B Polyprotein) und/oder auf das Verhältnis von NS2/NS3 zurückzuführen. Basierend auf diesen Beobachtungen, sollte deshalb untersucht werden, ob es möglich ist die Mutation 3/V132A durch die Austausche 4A/L45A bzw. 4A/Y47A im bicistronischen Viruskontext funktionell zu ersetzen. Dafür wurde zusätzlich zum NCP7 NS2-IRES-NS3 Derivat eine weitere Variante generiert, die N-terminal des NS3 für Ubiquitin kodierte (NCP7 NS2-IRES-Ubi-NS3) (Abb. 4.10 A). Basierend auf diesen Derivaten wurden Varianten generiert, welche die Kombination aus 2/E440V mit 3/V132A enthielten bzw. anstelle von 3/V132A die Austausche L45A bzw. Y47A in der NS4A Kink-Region mit der 2/E440V Mutation kombinierten.

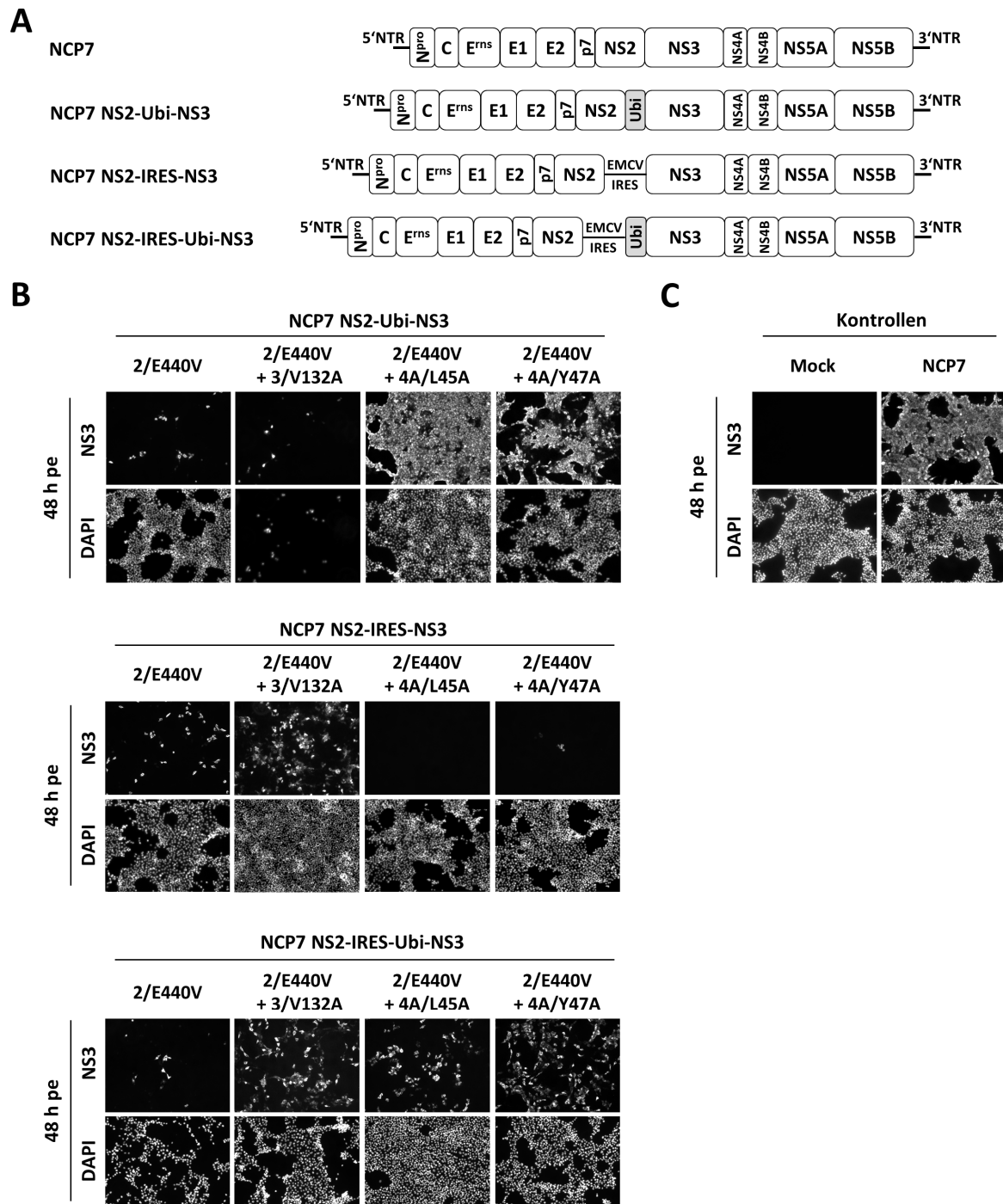


Abb. 4.10: Funktionelle Substitution von 3/V132A durch die Mutationen 4A/L45A bzw. 4A/Y47A in der NS2-3-unabhängigen Virionmorphogenese im bicistronischen Viruskontext. (A) Schematische Darstellung von NCP7 und dem monocistronischen NCP7 NS2-Ubi-NS3 Derivat, welches zwischen NS2 und NS3 eine Ubiquitininsertion (Ubi) aufweist. Die beiden bicistronischen RNA-Genome weisen zwischen NS2 und NS3 eine EMCV-IRES auf. NCP7 NS2-IRES-Ubi-NS3 kodiert im zweiten ORF für Ubiquitin N-terminal von NS3. Die Strukturproteine (C, E^{rms} , E1, E2) und NS-Proteine (N^{pro} , p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) sind eingezeichnet. NTR: Nichttranslatierte Region. (B) Untersuchungen zur Virionmorphogenese. MDBK-Zellen wurden mit $1 \mu\text{g}$ *in vitro* transkribierter RNA des entsprechenden Virus bzw. Virusderivats elektroporiert. 48 h pe wurden die Zellkulturüberstände gesichert und sterilfiltriert. Es erfolgte der indirekte Nachweis zur Virusausbreitung mittels NS3-spezifischer IF. Die Zellkerne wurden mittels DAPI nachgewiesen. Die entsprechenden Mutationen in NS2 (2/E440V), NS3 (3/V132A) und NS4A (4A/L45A, 4A/Y47A) sind eingezeichnet. Mock: MDBK-Zellen, die nicht mit RNA elektroporiert wurden; n.d.: nicht durchgeführt.

Die Untersuchung der Kompetenz zur NS2-3-unabhängigen Virionmorphogenese mit dem NCP7 NS2-**IRES**-NS3 bzw. NCP7 NS2-**IRES-Ubi**-NS3 Derivaten erfolgte über die RNA-Elektroporation von 1 µg *in vitro* transkribierter viraler RNA in MDBK-Zellen. 48 h pe erfolgte der Nachweis der viralen Replikation durch NS3-spezifische IF (Abb. 4.10 B) sowie die Bestimmung der Virustiter in den Zellkulturüberständen in TCID₅₀/ml (Tab. 4.1). Zum Vergleich wurden NCP7 WT sowie die monocistronischen NCP7 NS2-**Ubi**-NS3 Derivate mit den entsprechenden Kombinationen aus der Mutation 2/E440V mit 3/V132A, 4A/L45A oder 4A/Y47A in die Analyse miteinbezogen als auch die NCP7 NS2-**Ubi**-NS3 Variante, die nur für 2/E440V kodiert (Abb. 4.10 B - oben). Wie erwartet waren NCP7 WT und die NCP7 NS2-**Ubi**-NS3 Varianten (2/E440V + 3/V132A), (2/E440V + 4A/L45A) sowie (2/E440V + 4A/Y47A) nach 48 h pe zur effizienten Replikation (Abb. 4.10 B - oben) und Virionmorphogenese mit Virustitern zwischen $5,2 \times 10^6$ - $1,1 \times 10^8$ TCID₅₀/ml (Tab. 4.1) befähigt, wohingegen für NCP7 NS2-**Ubi**-NS3 (2/E440V) nur geringe Virustiter von $1,3 \times 10^3$ TCID₅₀/ml ermittelt werden konnten.

Die Untersuchung der bicistronischen Virusderivate zeigte erwartungsgemäß ein anderes Bild. Für NCP7 NS2-**IRES**-NS3 (2/E440V + 3/V132A) war bereits in früheren Arbeiten beobachtet worden, dass diese Variante zur RNA-Replikation und zur moderaten Virionmorphogenese mit Titern von ca. $6,4 \times 10^3$ TCID₅₀/ml befähigt ist (Klemens et al., 2015). Interessanterweise konnte für NCP7 NS2-**IRES**-NS3 (2/E440V + 4A/L45A) bzw. NCP7 NS2-**IRES**-NS3 (2/E440V + 4A/Y47A) nach 48 h pe keine Virionmorphogenese detektiert werden (Abb. 4.10 B - mittig) (Tab. 4.1). Ferner ließen sich für diese Virusderivate nach 48 h pe nahezu keine NS3-positiven Zellen detektieren, was impliziert, dass diese bicistronischen Virusgenome z.T. stark eingeschränkte RNA-Replikationsfähigkeiten besitzen (Abb. 4.10 B - mittig).

Im Vergleich zur Generierung von NS3 im NCP7 NS2-**IRES**-NS3 Kontext, führte die Präsenz eines Ubiquitins am N-Terminus des NS3 zu einer effizienten Generierung von authentischem NS3 und zur verbesserten RNA-Replikationseffizienz der entsprechenden viralen RNAs (Abb. 4.10 B - unten). In diesem NCP7 NS2-**IRES-Ubi**-NS3 Kontext war eine verbesserte Virionmorphogenese für das 3/V132A Derivat mit $2,4 \times 10^4$ TCID₅₀/ml erkennbar. Ferner konnte die Ausbreitungsfähigkeit, wenn auch nur schwach, von NCP7 NS2-**IRES-Ubi**-NS3 (2/E440V + 4A/L45A) mit $6,4 \times 10^4$ TCID₅₀/ml detektiert werden (Abb. 4.10 B - vgl. mittig mit unten und Tab. 4.1). Die Variante NCP7 NS2-**IRES-Ubi**-NS3 (2/E440V + 4A/Y47A) erreichte vergleichbare Virustiter, wie das 3/V132A Derivat, mit $6,4 \times 10^4$ TCID₅₀/ml (Abb. 4.10 B – vgl. mittig mit unten und Tab. 4.1).

Tabelle 4.1 Virustiter zu den Untersuchungen zur funktionellen Substitution von 3/V132A durch die Mutationen 4A/L45A bzw. 4A/Y47A in der NS2-3-unabhängigen Virionmorphogenese im bicistronischen Viruskontext.

Viruskontext	Mutationen	RNA-Replikation	Titer 48 h pe (TCID ₅₀ /ml)
NCP7 WT	-	+	1,1 x 10 ⁸
NCP7 NS2-Ubi-NS3	2/E440V	+	1,3 x 10 ³
	2/E440V + 3/V132A	+	5,2 x 10 ⁶
	2/E440V + 4A/L45A	+	2,7 x 10 ⁷
	2/E440V + 4A/Y47A	+	8,2 x 10 ⁷
NCP7 NS2-IRES-NS3	2/E440V	+	< 10 ²
	2/E440V + 3/V132A	+	6,4 x 10 ³
	2/E440V + 4A/L45A	-	n.d.
	2/E440V + 4A/Y47A	-	n.d.
NCP7 NS2-IRES-Ubi-NS3	2/E440V	+	< 10 ²
	2/E440V + 3/V132A	+	2,3 x 10 ⁴
	2/E440V + 4A/L45A	+	4,6 x 10 ²
	2/E440V + 4A/Y47A	+	6,4 x 10 ⁴

n.d.: nicht durchgeführt

Im letzten Teil zur Untersuchung der NS2-3-unabhängigen Virionmorphogenese im Gesamtklonkontext sollte die Frage beantwortet werden, ob die Mutation 2/E440V immer noch essentiell benötigt wird, wenn die Mutationen 4A/L45A oder 4A/Y47A anstelle der 3/V132A im Genom vorliegen (Abb. 4.11). Diese Fragestellung wurde mit den NCP7 NS2-Ubi-NS3 Derivaten 4A/L45A bzw. 4A/Y47A untersucht. Zum Vergleich wurden NCP7 WT, NCP7 (5B/GAA), NCP7 NS2-Ubi-NS3 sowie NCP7 NS2-Ubi-NS3 (2/E440V + 3/V132A) und das NCP7 NS2-Ubi-NS3 (2/E440V) mit in die Analyse einbezogen.

MDBK-Zellen wurden mit 1 µg *in vitro* transkribierter viraler RNA der entsprechenden Virusgenome elektroporiert und die RNA-Replikationsfähigkeit 24 h pe untersucht. Wie erwartet, ließ sich für jede virale RNA, bis auf NCP7 (5B/GAA), RNA-Replikation durch die Detektion von NS3-positiven Zellen nach 24 h pe nachweisen (Abb. 4.11 – oben: RNA-Replikation). 48 h pe wurden 500 µl der Zellkulturüberstände dazu verwendet naive MDBK-Zellen zu inokulieren. 72 h pi erfolgte die Detektion infizierter Zellen mittels NS3-spezifischer IF. Dieses Experiment demonstrierte, dass die NCP7 NS2-Ubi-NS3 Derivate mit 4A/L45A bzw. 4A/Y47A nicht in der Lage waren infektiöse Viren auszubilden, da 72 h pi keine infizierten Zellen nachweisbar waren (Abb. 4.11 – unten: Infektion). Wie erwartet konnte NCP7 NS2-Ubi-NS3 ebenfalls keine infektiösen Virionen ausbilden, während die Abundanz der NS2-Mutation E440V in diesem Kontext zu einer moderaten Virionmorphogenese führte. NCP7 NS2-Ubi-NS3 (2/E440V + 3/V132A) zeigte erwartungsgemäß eine effizientere Ausbreitung in der Zellkultur (Abb. 4.11 – unten: Infektion).

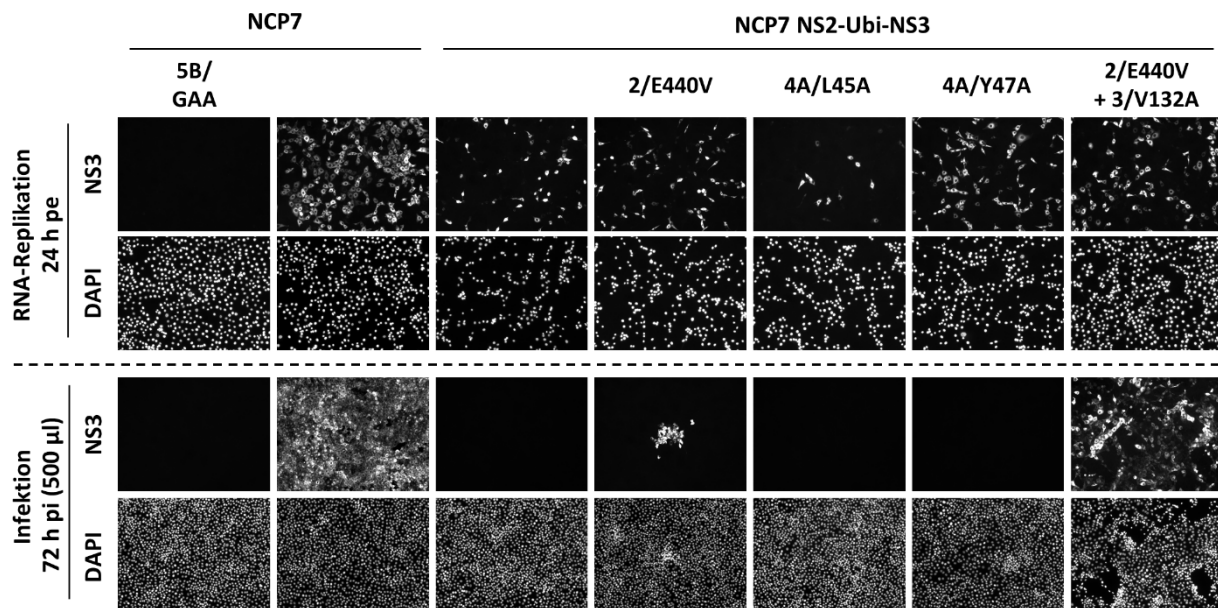


Abb. 4.11: Die Mutation E440V im NS2 ist für die NS2-3-unabhängige Virionmorphogenese auch dann noch essentiell, wenn die Austausch L45A bzw. Y47A im NS4A vorliegen. Qualitative Untersuchungen hinsichtlich der RNA-Replikationsfähigkeit und Ausbreitung verschiedener Virusderivate. MDBK-Zellen wurden mit 1 µg *in vitro* transkribierter viraler RNA elektroporiert. 24 h pe erfolgte der Nachweis der RNA-Replikationsfähigkeit indirekt mittels NS3-spezifischer IF (RNA-Replikation – oben). 48 h nach Elektroporation wurden die Zellkulturüberstände gesichert und sterilfiltriert. Für den Nachweis, ob in diesen ZK-Überständen infektiöse Viren vorhanden sind, wurden 500 µl davon genutzt, um naive MDBK-Zellen zu inokulieren. 72 h pi wurden infizierte Zellen mittels NS3-spezifischer IF detektiert (Infektion – unten). Die Zellkerne wurden mittels DAPI nachgewiesen. Die entsprechenden Mutationen im NS2 (2/E440V), NS3 (3/V132A) und NS4A (4A/L45A, 4A/Y47A) sind eingezeichnet. 5B/GAA: replikationsinkompetente Mutante des NS5B.

Die durchgeführten Studien zur NS2-3-unabhängigen Virionmorphogenese zeigen eindrücklich, dass der kritische Austausch in der NS3 Proteasedomäne V132A durch die Einzelmutationen L45A bzw. Y47A in der NS4A Kink-Region funktionell ersetzt werden kann. Diese Substitution konnte mit hoher Effizienz im monocistronischen Viruskontext nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse ließen sich auch auf den bicistronischen Viruskontext übertragen, wobei dies einen authentischen N-Terminus des NS3 voraussetzte. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Viren mit den Mutationen 4A/L45A bzw. 4A/Y47A auf den Austausch in der NS2 Proteasedomäne E440V essentiell angewiesen sind, um NS2-3-unabhängig Virionen ausbilden zu können.

4.6 *Trans*-Komplementationsstudien zeigen, dass die replikations-inkompetente Doppelmutante NS4A/L45-Y47-AA funktionell in der NS2-3-unabhängigen Virionmorphogenese ist

Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, dass sich BVDV an eine NS2-3-unabhängige Virionmorphogenese adaptieren lässt. Die Grundlage für diese Adaptation sind Einzelmutationen im NS2 und NS3. Die NS3 Adaptation 3/V132 beeinflusst dabei die Protein-Protein Wechselwirkungen an der NS3/4A-Kink Interaktionsfläche, wobei sich Störungen dieser Assoziationen unterschiedlich stark

auf die RNA-Replikationseffizienz auswirken. Diese Beobachtungen führten zu der Hypothese, dass in infizierten Zellen zwei Konformationen des NS3/4A-Komplexes unterschiedliche Prozesse im viralen Lebenszyklus entscheidend beeinflussen. Während die kompakte NS3/4A Konformation essentiell für den Zusammenbau der viralen Replikase und funktionell in der viralen RNA-Replikation ist, übernimmt die offene NS3/4A Konformation im Zusammenwirken mit NS2 funktionelle Aufgaben in der Virionmorphogenese.

In den Analysen hatte sich gezeigt, dass die NS3/4A-Kink Oberflächeninteraktion bei der NS4A-Doppelmutante (L45-Y47-AA) am stärksten abgeschwächt war und somit durch die 4A/L45-Y47-AA Mutation eine offene NS3/4A Komplexkonformation erreicht wird. Diese offene NS3/4A Komplexformation unterstützt keine RNA-Replikation mehr (vgl. Abb. 4.3 mit 4.6 und 4.7). Nach der oben beschriebenen Hypothese müsste dieser mutierte NS3/4A Komplex jedoch weiterhin in der Lage sein, die NS2-3-unabhängige Virionmorphogenese zu vermitteln. Da dies aufgrund der inhibierten RNA-Replikation durch die NS4A-Doppelmutation nicht im Volllängevirus-Kontext untersucht werden konnte, wurde ein *trans*-Komplementationsassay entwickelt. Dieser wurde in Anlehnung zu bereits veröffentlichten Studien der CSFV Virionmorphogenese aufgebaut (Abb. 4.12) (Moulin et al., 2007). Grundlage dieses modifizierten Assays ist das BVDV Volllängevirus-Derivat NCP7 NS2-Ubi-NS3, welches nicht in der Lage ist, infektiöse Virionen zu bilden. In diesem experimentellen Kontext wurde untersucht, inwiefern der Verpackungsdefekt des NCP7 NS2-Ubi-NS3 durch die Ko-Expression verpackungskompetenter Varianten des BVDV Proteinbereiches E2-4A *in trans* komplementiert werden kann. Da sich MDBK-Zellen nur sehr schwer mit DNA transfizieren lassen, wurden die *trans*-Komplementationsstudien in SK6-Zellen durchgeführt (Moulin et al., 2007). Die E2-4A Ko-Expression erfolgte MVA-T7^{pol}-vermittelt von dem Plasmid pCITE E2-4A in mit NCP7 NS2-Ubi-NS3 RNA elektroporierten SK6 Zellen (Abb. 4.12 A). Die *in trans* exprimierten BVDV E2-4A Polyproteinderivate (WT und NS2-Ubi-NS3) führten zur Generierung unterschiedlicher NS2-3 Proteine: In seiner Wildtyp Form (primär als ungespaltenes NS2-3 vorliegend) unterstützt es die Verpackung von NCP7 NS2-Ubi-NS3. Im Gegensatz dazu ist durch die Expression von E2-4A (NS2-Ubi-NS3) eine vollständige NS2-3-Prozessierung in NS2-Ubi und NS3 durch Ubiquitinhydrolasen gewährleistet und damit liegt kein NS2-3 in den Zellen vor. Die Virionmorphogenese von NCP7 NS2-Ubi-NS3 kann somit durch die Ko-Expression von E2-4A (NS2-Ubi-NS3) funktionell nicht komplementiert werden. Die MVA-T7^{pol}-vermittelte Kontrolleexpression und Western Blot Analyse der beiden Basiskonstrukte zeigte die erwartete Prozessierung der entsprechenden Polyproteine (Abb. 4.12 B).

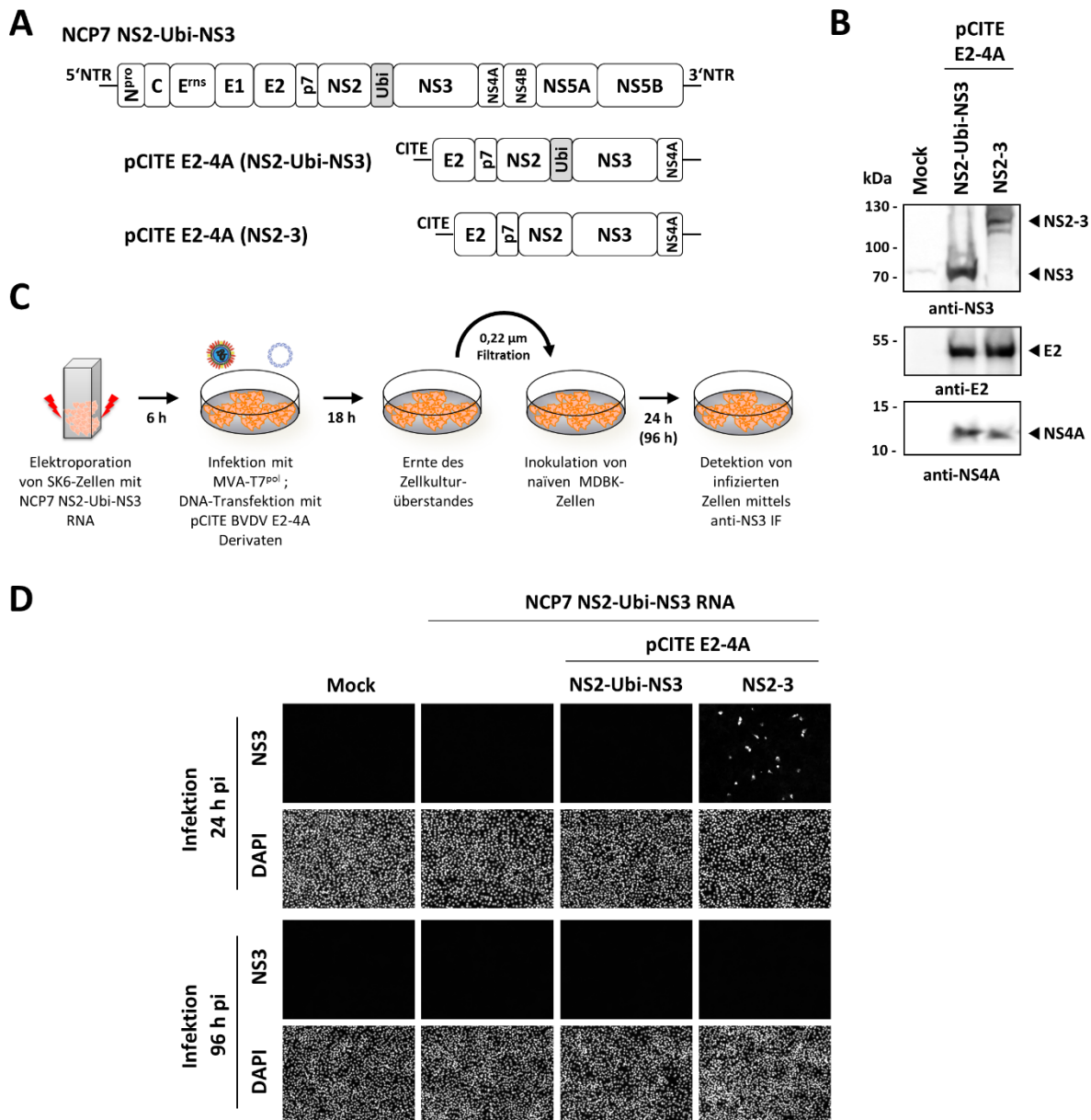


Abb. 4.12: *Trans*-Komplementationsassay zur Charakterisierung der NS2-3-unabhängigen Virionmorphogenese. (A) Schematische Darstellung der BVDV Volllänge cDNA NCP7 NS2-Ubi-NS3 und der Expressionskonstrukte pCITE E2-4A (NS2-Ubi-NS3) und pCITE E2-4A (NS2-3) zur Expression von BVDV E2-4A Derivaten. Die Strukturproteine (C, E^{ms}, E1, E2) und NS-Proteine (N^{pro}, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) sind gekennzeichnet. Ubi: Ubiquitin; NTR: Nichttranslatierte Region; CITE: EMCV-IRES. (B) Expression von BVDV E2-4A Derivaten WT und NS2-Ubi-NS3. Die entsprechenden pCITE E2-4A Konstrukte wurden im Huh7-T7/MVA-T7^{pol} Systems exprimiert. Nach 18 h erfolgte die Zellyse und Analyse der Proteinproben mittels SDS-PAGE/WB (E2, NS3: 8% Acrylamid; NS4A: 10% Acrylamid). kDa: Proteinmarker in Kilodalton. Mock: Zellen, die nicht mit DNA transfiziert wurden. (C) Schematischer Ablauf des *trans*-Komplementationsexperimentes. SK6-Zellen werden mit 1 μg *in vitro* transkribierter NCP7 NS2-Ubi-NS3 RNA elektroporiert. 6 h pe erfolgt die MVA-T7^{pol} Infektion für 1 h bei 37°C. Anschließend wurden die pCITE E2-4A Derivate transfiziert. In den elektroporierten und transfizierten Zellen erfolgt die NCP7 NS2-Ubi-NS3 Replikation und die T7-vermittelte Ko-Expression der E2-4A Polyproteine. 18 h nach der Elektroporation werden die Zellkulturüberstände gesichert und sterilfiltriert. Zum Nachweis von infektiösen Viren in den Überständen werden diese genutzt, um naive MDBK-Zellen zu inokulieren. 24 h pi werden infizierte Zellen mittels anti-NS3 IF detektiert. (D) Auswertung des *trans*-Komplementationsexperimentes. Anti-NS3-spezifische Immunfluoreszenzanalysen von Infektionen naiver MDBK Zellen 24 h pi und 96 h pi. Die Zellkerne wurden mittels DAPI nachgewiesen.

Für das *trans*-Komplementationsexperiment wurden zunächst SK6-Zellen mit NCP7 NS2-Ubi-NS3 RNA elektroporiert (Abb. 4.12 C). 6 h pe erfolgte die Transfektion der entsprechenden pCITE E2-4A Derivate, um die Ko-Expression der E2-4A Polyproteinfragmente für weitere 18 h zu ermöglichen. Die Zellkulturüberstände wurden nach Abschluss der Ko-Expression gesichert und sterilfiltriert. Zum Nachweis von infektiösen Viruspartikeln in den erhaltenen Überständen, wurden naive MDBK-Zellen mit diesen inokuliert. Eine erfolgreiche Infektion wurde durch die Detektion von viralem NS3 24 h pi bestätigt. Wie erwartet, konnte die Ko-Expression von Wildtyp E2-4A (und damit von WT NS2-3) die defekte Virionmorphogenese von NCP7 NS2-Ubi-NS3 funktionell ausgleichen und die Bildung von infektiösen Viruspartikeln ermöglichen, wohingegen die Ko-Expression mit E2-4A (NS2-Ubi-NS3) zu keiner detektierbaren Assemblierung von Viruspartikeln führte (Abb. 4.12 D – oben: Infektion, 24 h pi, vgl., NS2-3 mit NS2-Ubi-NS3) (Moulin et al., 2007). Die detektierten Viruspartikel könnten u.U. auch durch RNA-Rekombinationen zwischen der NCP7 NS2-Ubi-NS3 RNA und der E2-4A RNA und die damit einhergehende Entstehung von verpackungs- und replikationsfähigen Virusgenomen entstanden sein. Um auszuschließen, dass solche verpackungs- und replikationsfähigen Virusgenome die Ursache für die detektierten infektiösen Viruspartikel sind, wurden infizierte Zellen zusätzlich nach 96 h pi analysiert. Es konnten zu diesem späten Zeitpunkt weder NS3-positive Infektionsfoci noch infizierte Einzelzellen detektiert werden. Diese Beobachtung bestätigte, dass die NS3-positiven infizierten Zellen 24 h pi aus Infektionen mit NCP7 NS2-Ubi-NS3 resultierten, dessen Verpackung durch *trans*-Komplementation mit WT E2-4A (NS2-3) ermöglicht worden war. Aufgrund der Zytopathogenität der verpackten NCP7 NS2-Ubi-NS3 RNA konnten diese Zellen jedoch zum Zeitpunkt 96 h pi nicht mehr detektiert werden, da die unregulierte RNA-Replikation der viralen RNA zum Absterben der infizierten Zellen führte (Abb. 4.12 D – unten: Infektion, 96 h pi).

Im nächsten Schritt sollte mithilfe des *trans*-Komplementationsassays getestet werden, inwiefern verschiedene Varianten des E2-4A (NS2-Ubi-NS3) den NCP7 NS2-Ubi-NS3 Verpackungsdefekt ausgleichen können. Dabei kodierten diese Derivate für ein NS2 Protein mit der für die NS2-3-unabhängige Virionmorphogenese essentiellen NS2 Mutation 2/E440V, die mit verschiedenen NS3 bzw. NS4 Mutationen (3/V132A, 4A/L45A, 4A/Y47A, bzw. 4A/L45-Y47-AA) an der NS3/4A-Kink Interaktionsoberfläche kombiniert wurden (Abb. 4.13). Um zu verdeutlichen wie kritisch die Abschwächung der NS3/4A-Kink Interaktion für die NS2-3-unabhängige Virionmorphogenese ist, wurde ein E2-4A Derivat mitgeführt, welches nur die E440V NS2 Mutation aufwies. Die E2-4A Varianten mit einer Kombination von 2/E440V und einer Einzelmutation der NS3/4A-Interaktionsfläche (3/V132A, 4A/L45A und 4A/Y47A) im NS2-Ubi-NS3 waren in der Lage, den NCP7 NS2-Ubi-NS3 Verpackungsdefekt funktionell auszugleichen (Abb. 4.13 A und B).

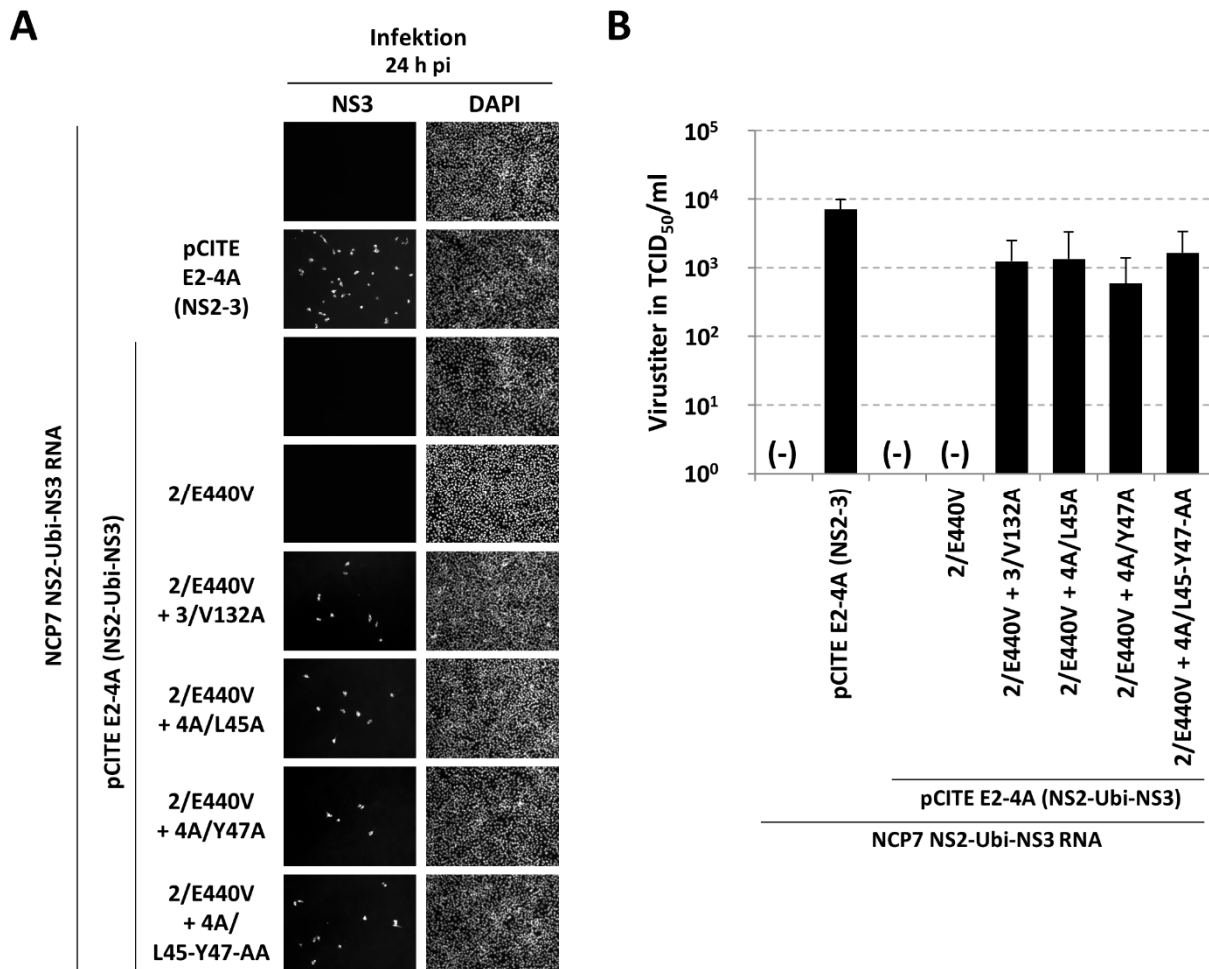


Abb. 4.13: Die NS4A-Doppelmutante NS4A/L45-Y47-AA ist funktionell in der Virionmorphogenese *in trans*. (A) SK6-Zellen wurden mit 1 µg *in vitro* transkribierter NCP7 NS2-Ubi-NS3 RNA elektroporiert. Nach 6 h erfolgte für 18 h die MVA-T7^{pol}-System vermittelte Expression der entsprechenden E2-4A Varianten *in trans*. Zum Nachweis von infektiösen Viren in den Zellkulturüberständen wurden naive MDBK-Zellen damit inokuliert. 24 h nach der Infektion wurden die infizierten Zellen mittels anti-NS3 IF detektiert. Die Zellkerne wurden durch DAPI-Färbung nachgewiesen. Die entsprechenden Mutationen im NS2 (E440V), NS3 (V132A) und NS4A (L45A, Y47A, L45-Y47-AA) sind gekennzeichnet. (B) Virustiter Bestimmung der Zellkulturüberstände des *trans*-Komplementations-experiments. Die Überstände aus dem *trans*-Komplementationsexperiment wurden auf naiven MDBK-Zellen titriert und die Virustiter in TCID₅₀/ml bestimmt. Der Graph zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen (n=3).

Für das Derivat E2-4A (2/E440V), welches für die NS2 Mutation E440V im NS2-Ubi-NS3 kodiert, konnte keine *trans*-Komplementation von NCP7 NS2-Ubi-NS3 nachgewiesen werden. Die Virustiter, welche als Resultat der *trans*-Komplementationen bestimmt werden konnten, waren mit Werten um 10³ TCID₅₀/ml um einen Faktor 1000 niedriger im Vergleich zu den Virustitern, die mit den entsprechenden bicistronischen NCP7 NS2-Ubi-NS3 Varianten beobachtet wurden (vgl. Abb. 4.8 und Abb. 4.13). Die *trans*-Komplementation mit E2-4A (NS2-3) ergaben Titer von ca. 7,1 × 10³ TCID₅₀/ml. Für die *trans*-Komplementation mit E2-4A (NS2-Ubi-NS3) Varianten mit den Kombinationen von 2/E440V mit 3/V132A, 4A/L45A oder 4A/Y47A wurden Virustiter von 1,3 × 10³ TCID₅₀/ml, 1,4 × 10³ TCID₅₀/ml, bzw. 5,9 × 10² TCID₅₀/ml ermittelt (Abb. 4.13 B). Für die E2-4A Variante (NS2-Ubi-NS3) mit der NS2 Mutation E440V konnte kein Virustiter bestimmt werden, was in Anbetracht der sehr niedrigen Virustiter im

bicistronischen Kontext (4.5×10^2 TCID₅₀/ml, siehe Abb. 4.8) und durch die geringe Effizienz des *trans*-Komplementationsassays erklärt werden kann.

Die NS4A/L45-Y47-AA Mutation führt dazu, dass der NS3/4A Komplex eine offene Konformation einnimmt, die die RNA-Replikation nicht mehr funktionell unterstützt. In dem *trans*-Komplementationsexperiment konnte gezeigt werden, dass ein NS3/4A Komplex mit der Mutation 4A/L45-Y47-AA im Verbund mit NS2 (E440V) in der Lage war, den Virionmorphogenesedefekt von NCP7 NS2-Ubi-NS3 *in trans* funktionell zu komplementieren ($1,7 \times 10^3$ TCID₅₀/ml) (Abb. 4.13 A und B).

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass der Defekt in der RNA-Replikation nicht darauf zurückzuführen ist, dass es sich dabei um einen unstrukturierten Proteinkomplex handelt, sondern dass dieser NS3/4A-Komplex eine andere Konformation eingenommen hat, durch die er funktionell in der NS2-3-unabhängigen Virionmorphogenese ist. Somit unterstützen die Ergebnisse der RNA-Replikationsstudien und des *trans*-Komplementationsassays die Hypothese, dass die Ausbildung unterschiedlicher Konformationen des NS3/4A-Komplexes die molekulare Grundlage dafür ist, ob ein NS3/4A-Komplex in der RNA-Replikation oder in der Virionmorphogenese funktionell ist.

4.7 Die Anwesenheit von NS2 im pestiviralen Verpackungskomplex NS2-3/4A moduliert die Interaktion zwischen der NS3 Proteasedomäne und der NS4A Kink-Region

Die Abschwächung der NS3/4A-Kink Interaktion ist offensichtlich eine Grundvoraussetzung, damit ein NS3/4A-Komplex in der pestiviralen NS2-3-unabhängigen Virionmorphogenese als Verpackungsmolekül genutzt werden kann. In Wildtyp Pestiviren stellt das ungespaltene NS2-3 im Verbund mit NS4A (NS2-3/4A) das Verpackungsmodul dar. Dadurch ist zu vermuten, dass ungespaltenes NS2-3 im NS2-3/4A Komplex nur eine schwache NS3/4A-Kink Interaktion erlaubt und damit zu einer offenen NS2-3/4A Komplexkonformation führt, ähnlich wie die beschriebenen NS3 und NS4A Mutationen dieser Interaktionsfläche. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde mit dem Derivat pCITE p7-NS2-3-NS4A₍₁₋₄₉₎-TEV-GST ein TEV^{pro}-Spaltungsassay durchgeführt und mit pCITE Ubi-NS3-4A₍₁₋₄₉₎-TEV-GST verglichen. Das Derivat pCITE p7-NS2-3-NS4A₍₁₋₄₉₎-TEV-GST kodiert für die Proteine p7 und NS2 des BVDV-1 Stammes NCP7 (Abb. 4.14 A und B). Das p7-Gen wurde in das Konstrukt eingebracht, da es die Signalsequenz für NS2 enthält und dessen korrekte Einlagerung in die ER-Membran ermöglicht. Des Weiteren erlaubt der p7-NS2 Übergang die Generierung des authentischen NS2 N-Terminus (Elbers et al., 1996). Die beiden pCITE-Konstrukte wurden im Huh7-T7/MVA-T7^{pol}-Systems ohne oder zusammen mit HA-TEV^{pro} exprimiert und die TEV^{pro}-vermittelten GST-Abspaltungen entsprechend quantifiziert (Abb. 4.14 C und D).

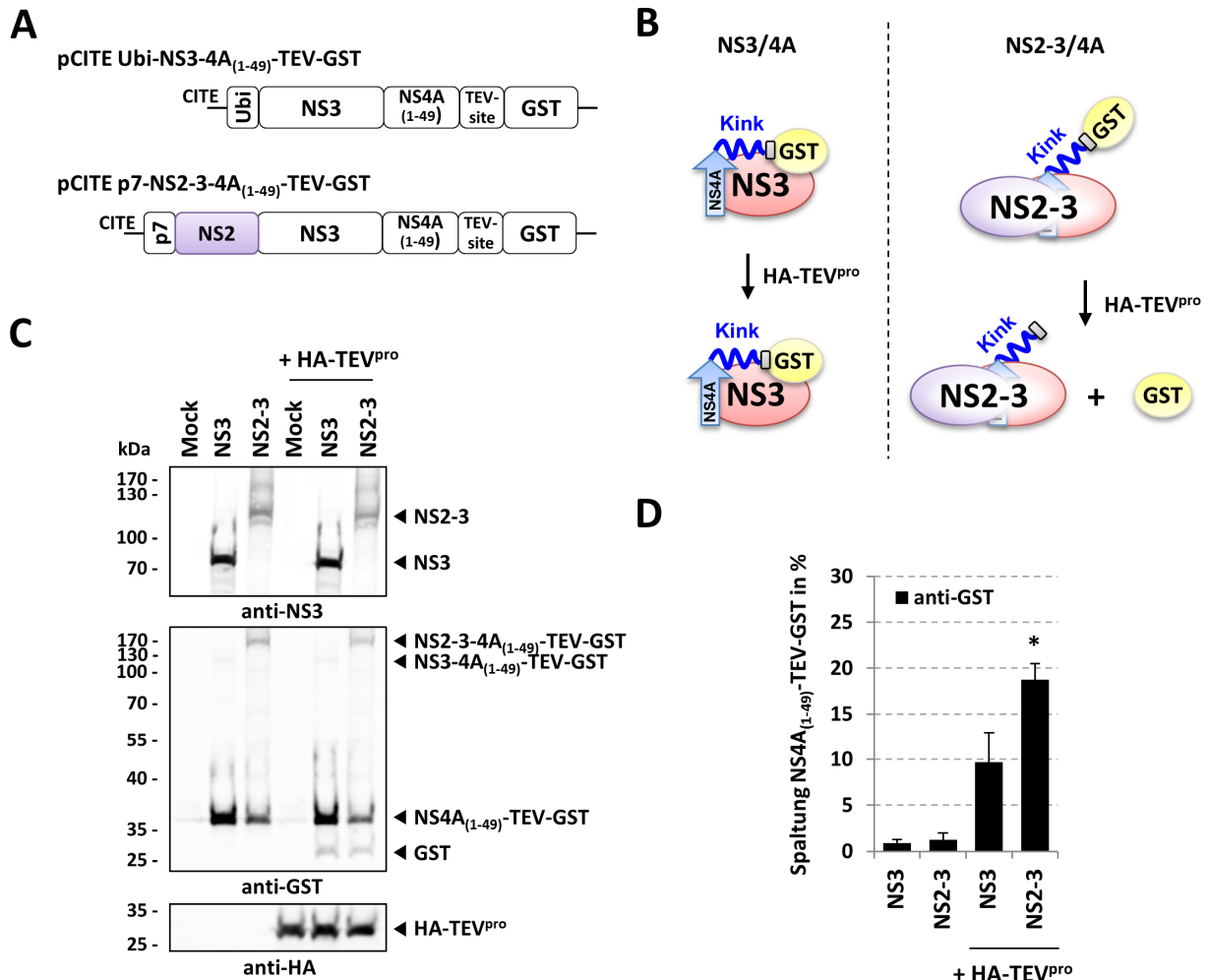


Abb. 4.14: Die Anwesenheit von ungespaltenem NS2-3 im NS2-3/4A-Komplex reduziert die NS3/4A-Kink Interaktion. (A) Aufbau der verwendeten Konstrukte pCITE Ubi-NS3-4A₍₁₋₄₉₎-TEV-GST und pCITE p7-N2-3-NS4A₍₁₋₄₉₎-TEV-GST. pCITE p7-N2-3-NS4A₍₁₋₄₉₎-TEV-GST kodiert für p7-NS2 des BVDV-1 Stammes NCP7 und enthält somit Volllänge NS2-3. (B) Schematische Darstellung des TEV^{pro}-Spaltungsassay für die entsprechenden Konstrukte. Im NS3/4A-Komplex ist eine starke Assoziation zwischen NS3 (rot) und der NS4A Kink-Region (Kink) möglich, wodurch die Zugänglichkeit der TEV-Spaltstelle für HA-TEV^{pro} gering ist (links). Die Anwesenheit von NS2-3 reduziert die NS3/4A-Kink Interaktion und ermöglicht eine erhöhte Zugänglichkeit der TEV-Spaltstelle für HA-TEV^{pro} (rechts). NS4A (blau) und NS4A-Zentralpeptid (blauer Pfeil), TEV-Spaltstelle (grau), GST (gelb) sind eingezeichnet. (C) Western Blot Analysen des TEV^{pro}-Spaltungsassays. Die MVA-T7^{pol}-vermittelte Expression erfolgte in Abwesenheit (links) oder Anwesenheit von HA-TEV^{pro} (rechts) für 18 h. Die Analyse der Spaltungsraten wurde im Western Blot mittels anti-NS3, anti-GST und anti-HA durchgeführt (für Details siehe Abb. 4.3). (D) Quantifizierung der NS4A₍₁₋₄₉₎-TEV-GST Spaltungsraten. Die Mittelwerte und entsprechende Standardabweichungen sind dargestellt (n=3). Die statistische Auswertung ergab einen signifikanten Unterschied zwischen der NS3- und der NS2-3 Variante mit p = 0.013 (*; Student's t-test).

Die Anwesenheit von NS2-3 im NS2-3/4A Komplex führte zu einer deutlichen Erhöhung der TEV^{pro}-Spaltungsraten auf 19% im Vergleich zu den ermittelten TEV^{pro}-Spaltungsraten für pCITE Ubi-NS3-4A₍₁₋₄₉₎-TEV-GST von ca. 10% (Abb. 4.14 C und D). Statistische Auswertung dieser Ergebnisse belegten, dass dieser Unterschied statistisch signifikant war (p = 0.013, Student's t-test) (Abb. 4.14 D). Diese Ergebnisse legten nahe, dass der NS2-3/4A Komplex eine Konformation eingeht, in der die NS4A Kink-Region nur eine abgeschwächte Interaktion mit der NS3-Proteaseoberfläche eingehen kann und diese für die TEV-Protease stärker zugänglich ist (Abb. 4.14 B). Eine solche Konformation ähnelt

offensichtlich der NS3/4A-Komplexbildung, in denen die NS3/4A-Kink Interaktionsoberfläche mutiert wurde.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Modulierung der NS3/4A-Kink Interaktion, durch Mutationen an der NS3/4A-Kink Interaktionsfläche bzw. durch die Anwesenheit von NS2-3 im NS2-3/4A Komplex, mit einer Konformationsänderung zu einem weniger kompakten Proteinkomplex einhergeht. Die funktionellen Untersuchungen lassen den Schluss zu, dass diese offene Konformation die Virionmorphogenese funktionell unterstützt.

5. Diskussion

Aufgrund ihrer geringen Genomgröße kodieren Plusstrang RNA-Viren nur für eine limitierte Anzahl von Proteinen. Um die komplexen viralen Prozesse, wie die RNA-Replikation und die Virusassemblierung effizient durchzuführen zu können, üben viele der viralen Proteine mehrere Funktionen aus. Ein gutes Beispiel dafür ist das multifunktionelle NS3-Protein, welches im Verbund mit seinem Kofaktor NS4A sowohl für die virale Polyproteinprozessierung als auch für die RNA-Replikation essentiell ist (Behrens et al., 1998; Tautz et al., 2000). In diesem Kontext ist auch die funktionelle Besonderheit der *Flaviviridae* zu sehen, ihre Nichtstrukturproteine nicht nur in der viralen RNA-Replikation sondern auch im Prozess der Virionmorphogenese zu verwenden (Murray et al., 2008a).

Um diese räumlich und zeitlich voneinander getrennten Prozesse durch ein limitiertes Repertoire an viralen Proteine zu unterstützen, wird vermutet, dass die regulierte Zusammenlagerung multifunktionaler Virusproteine (z.B. NS3 mit NS4A) in verschiedene Proteinkomplexe zur spezifischen Rekrutierung weiterer zellulärer- oder viraler Interaktionspartner (z.B. Strukturproteine in der Virionmorphogenese) führt, um essentielle Funktionen in der RNA-Replikation oder in der Virionmorphogenese ausüben zu können. Über die genaue Zusammensetzung dieser Komplexe und die molekularen Details zum koordinierten Übergang von Replikasekomplexen in virale Verpackungskomplexe ist bisher nur wenig bekannt.

Eine weitere Form der Regulation im Lebenszyklus von Plusstrang RNA-Viren besteht in der kontrollierten Prozessierung des viralen Polyproteins durch zelluläre- und virale Proteasen, da auf diese Weise die Aktivität von Proteinen zeitlich und räumlich gesteuert werden kann. Die Proteinreifung durch Polyproteinprozessierung ist außerdem eine Möglichkeit, Proteinfunktionen temporär zu regulieren (Tautz et al., 2015; Yost and Marcotrigiano, 2013). So sind Pestiviren in ihrem Lebenszyklus während der RNA-Replikation und Virionmorphogenese, auf Proteinkomplexe angewiesen, deren Zusammensetzung und Funktion sich durch die Prozessierung des NS2-3-4A Vorläuferproteins verändern. Während der vollständig prozessierte NS3/4A-Komplex essentiell für die RNA-Replikation ist und in diesem Prozess nicht durch den NS2-3/4A-Komplex funktionell ersetzt werden kann (Behrens et al., 1998; Lackner et al., 2004), wird ein Komplex aus ungespaltenem NS2-3 und NS4A (NS2-3/4A-Komplex) explizit für die Genese infektiöser Virionen benötigt (Agapov et al., 2004; Moulin et al., 2007). Die Präsenz beider Komplexe in Pestivirus-infizierten Zellen wird über eine regulierte Spaltung des NS2-3 Proteins erreicht, die effizient in der frühen Phase der Infektion erfolgt und somit zur verstärkten Bildung des NS3/4A-Komplexes führt, während im späteren Infektionsverlauf die NS2-3-Spaltung zugunsten der Generierung des NS2-3/4A-Komplexes abnimmt. Diese Regulation ist bedingt durch die Abhängigkeit der NS2-Proteaseaktivität von dem nur limitiert

vorhandenen zellulären Kofaktor Jiv (Becher and Tautz, 2011; Lackner et al., 2004). Dadurch entsteht im Verlauf der pestiviralen Infektion ein Gradient bzgl. der Ausbildung von NS3/4A und NS2-3/4A, der den Wechsel zwischen der RNA-Replikation und der Virionmorphogenese ermöglicht. Im Gegensatz zu Pestiviren, konnte für das nah verwandte HCV ungespaltenes NS2-NS3 und die Abhängigkeit der HCV-Virionmorphogenese von diesem Proteinvorläufer in Zellkultur bisher nicht nachgewiesen werden (Abb. 2.8) (Jirasko et al., 2008; Jones et al., 2007). Die essentielle Bedeutung von ungespaltenem NS2-3 für die Morphogenese von Pestiviren stellt somit einen wesentlichen, funktionell sehr interessanten Unterschied zu HCV dar (Tautz et al., 2015).

Interessanterweise können Pestiviren durch nur zwei Aminosäureaustausche, E440V in der NS2-Proteasedomäne und V132A in der NS3 Proteasedomäne, an die Virionmorphogenese mit NS2 und NS3 (NS2-3-unabhängig) adaptiert werden, also an ein Verpackungsschema ähnlich zu HCV (Abb. 2.9) (Klemens et al., 2015; Lattwein et al., 2012). Die Beantwortung der Frage, wie diese beiden Austausche die NS2-3-unabhängige Virionmorphogenese bei BVDV ermöglichen, leistet einen wichtigen Beitrag zum Verständnis des modularen Aufbaus und zur Multifunktionalität von pestiviralen Proteinkomplexen.

5.1 Strukturbasierte Untersuchungen zur Oberflächeninteraktion zwischen der NS3 Proteasedomäne und ihrem Kofaktor deuten auf verschiedene, funktionell relevante Proteinkomplexkonformationen hin

Der Aminosäureaustausch V132A in der NS3 Proteasedomäne wurde als eine essentielle Determinante der NS2-3-unabhängigen Virionmorphogenese identifiziert und war von zentraler Bedeutung für diese Arbeit. Da diese Mutation keine detektierbare Auswirkung auf die NS3 Proteaseaktivität hatte, wurde die Modulation von Protein-Protein-Interaktionen als molekulare Grundlage für die NS2-3-unabhängige Virionmorphogenese in Betracht gezogen (Klemens et al., 2015). Die Aufklärung der Kristallstruktur der „*single chain protease*“ (SCP) des CSFV NS3/4A-Komplexes legte die Grundlage für die vorliegende Arbeit und war wegweisend im Hinblick auf das molekulare Verständnis der Funktion des NS3/4A-Komplexes in der RNA-Replikation und seiner kritischen Bedeutung für die NS2-3-unabhängige Virionmorphogenese. Durch die detaillierten Einblicke in die Oberflächeninteraktionen innerhalb des CSFV NS3/4A-Komplexes, wurde eine gezielte Kombination aus Struktur- und Funktionsanalysen ermöglicht, die die Untersuchung des molekularen Mechanismus der NS2-3-unabhängigen Virionmorphogenese erlaubte.

Der CSFV NS3/4A-Komplex weist im Vergleich zum NS3/4A-Komplex von HCV (Kim et al., 1996; Yao et al., 1999) oder zum flaviviralen NS2B/NS3-Komplex von DENV oder ZIKV (Assenberg et al., 2009; Luo

et al., 2008; Zhang et al., 2016) eine grundsätzlich ähnliche Struktur auf (Abb. 5.1 - oben). Die vergleichbare Struktur weist auf die starke Verwandtschaft dieser Viren untereinander und die konservierte funktionelle Bedeutung dieser Komplexe hin. Aus der Struktur der SCP NS4A₃₇NS3 von CSFV wurde deutlich, dass sich NS4A über ein β -Faltblatt (Zentralpeptid) in den N-terminalen Bereich der NS3-Protease einlagert und so zur Strukturierung und zur Funktionalität der CSFV NS3 Proteasedomäne beiträgt (Abb. 4.1 B und 5.1 – CSFV, oben). Für die hepaci- und flavivirale NS3 Proteasedomäne konnte eine vergleichbare Einlagerung des entsprechenden Kofaktors und dessen Beitrag zur Stabilität und Funktionalität der NS3 Protease bereits demonstriert werden (Chambers et al., 1993; Droll et al., 2000; Yao et al., 1999; Zhang et al., 2016; Zuo et al., 2009). Wesentlich für die vorliegende Arbeit war die Identifikation der Oberflächeninteraktion zwischen dem C-terminalen Anteil des NS4A-Kofaktors und der NS3 Proteasedomäne (Abb. 4.1 B und C sowie 5.1 – CSFV, oben). Aus der CSFV NS3/4A-Kristallstruktur wird deutlich, dass diese hydrophoben Interaktionen durch die NS3-Aminosäure M132 und die NS4A-Aminosäuren L45 und Y47 vermittelt werden (Abb. 4.1 C). Die kristallographische Darstellung dieser Oberflächeninteraktionen für CSFV stellt einen wesentlichen Fortschritt in dem strukturellen Verständnis dieser zentralen Proteinkomplexe dar. Eine vergleichbare Oberflächeninteraktion konnte für den NS3/4A-Komplex von HCV bisher nicht identifiziert werden, u.a. da viele der bisher aufgeklärten NS3/4A-Strukturen mithilfe des minimalen NS4A-Zentralpepids als Kofaktor generiert wurden und somit der für die Oberflächeninteraktion nötige NS4A-Anteil nicht vorhanden war (Kim et al., 1996; LaPlante et al., 2010; Parsy et al., 2015). Die strukturellen Einblicke durch verschiedene SCP HCV NS3/4A-Kristallstrukturen brachten ebenfalls keinen Erkenntnisgewinn bezüglich einer detektierbaren Oberflächeninteraktion zwischen NS3 und NS4A, da auch hier stark verkürzte NS4A-Kofaktoranteile (AS 21-32) verwendet wurden (Soumana et al., 2016; Yao et al., 1999). Allerdings konnten aus strukturellen Untersuchungen der HCV SCP Protease/Kofaktor-Komplexe und weiteren funktionellen Charakterisierungen wertvolle Informationen zur Funktionalität des NS3/4A-Komplexes abgeleitet werden. So liegt der Komplex nach der NS3-NS4A Spaltung in einer kompakten „*cis-cleavage*“ Konformation vor, während der NS3/4A-Komplex durch seine NS4A-TM-vermittelte Membraneinlagerung eine gestreckte NS3-Konformation der NS3-Protease- und Helikasedomäne zueinander einnimmt (Brass et al., 2008; Yao et al., 1999). Eine solche Flexibilität verbunden mit spezifischen Protein-Protein-Interaktionen ist eine Grundlage für die Multifunktionalität dieser Proteinkomplexe. Ein Nachteil der SCP Strukturen ist sicherlich, dass diese Komplexe nicht alle funktionellen Aspekte eines authentischen NS3/4A-Proteinkomplexes abbilden. Insbesondere wird vermutet, dass sich die Konformationen, die aktiv in der RNA-Replikation oder Virionmorphogenese sind, teilweise von denen unterscheiden, die durch die „*cis-cleavage*“ Strukturen repräsentiert werden.

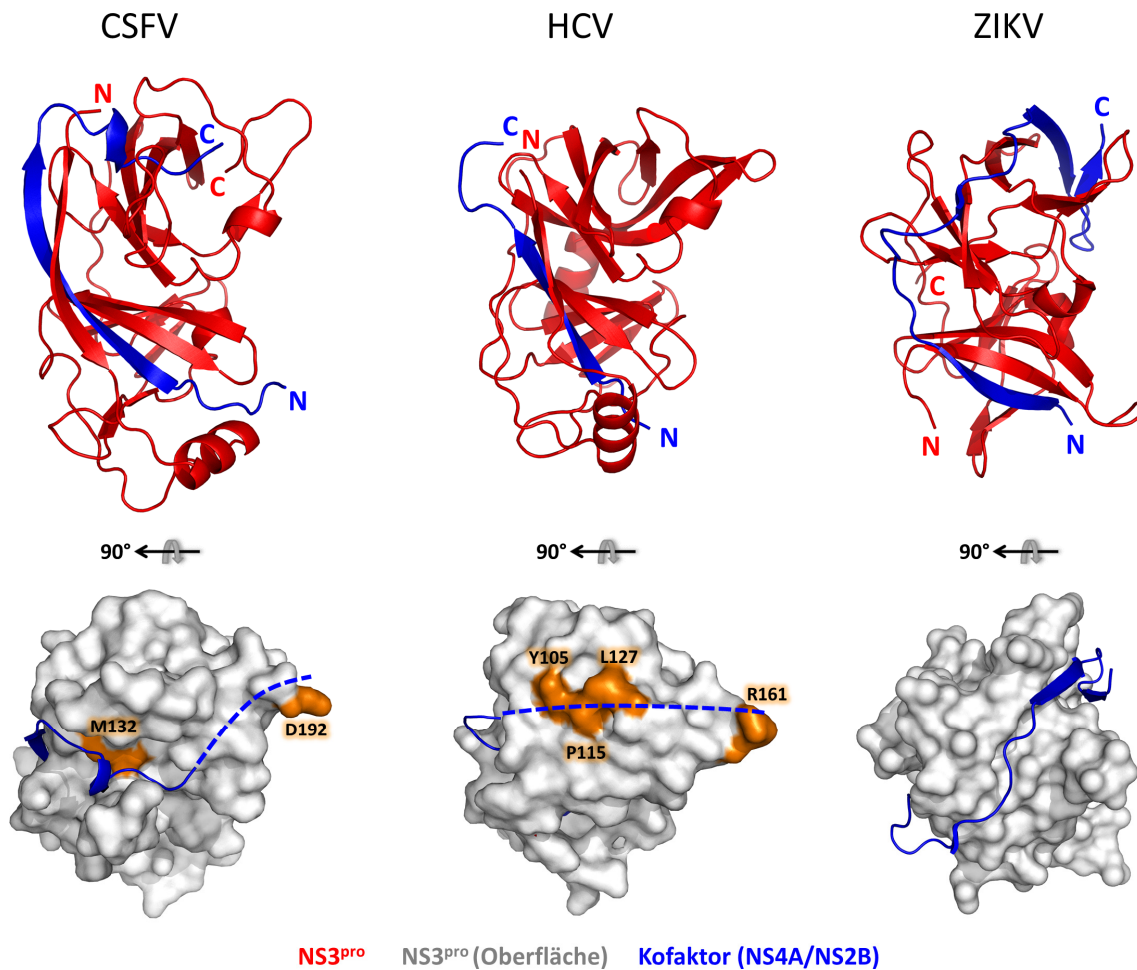


Abb. 5.1: Vergleich der NS3 Proteasedomänen im Komplex mit dem entsprechenden Kofaktor für CSFV, HCV und ZIKV. (oben) Röntgenkristallstrukturen der NS3 Proteasedomäne in Komplex mit dem Kofaktor NS4A (CSFV und HCV) bzw. NS2B (ZIKV) für verschiedene Vertreter der *Flaviviridae*. Die ermittelten Strukturen von CSFV NS4A₃₇NS3 (PDB accession number: 5LKL; diese Studie bzw. Dubrau *et al.*, 2017), HCV NS4A₁₄NS3 (PDB accession number: 1CU1, Yao *et al.*, 1999) und ZIKV NS2B-NS3 (PDB accession number: 5H4I, Zhang *et al.*, 2016) wurden mit dem Programm Pymol vergleichend in der Seitenansicht dargestellt. Rot: NS3-Protease; Blau: Proteasekofaktor NS4A (CSFV und HCV) bzw. NS2B (ZIKV); N: N-Terminus, C: C-Terminus. (unten) Oberflächenrepräsentation des jeweiligen Protease/Kofaktor-Komplexes nach der Rotation um 90°. Grau: NS3-Proteaseoberfläche; Orange: NS3-Oberflächenaminoacids; blaue gestrichelte Linie: hypothetische Interaktion des NS4A-Kofaktors mit der Oberfläche der NS3 Proteasedomäne.

Untersuchungen zu verschiedenen Konformationen von Proteinkomplexen würden enorm von der Expression- und Kristallisation eines authentischen NS3/4A-Komplexes profitieren. Denkbar hierfür ist die Verwendung des pDuet-Vektorsystems, das die bakterielle Ko-Expression von zwei Proteinfragmenten ermöglicht. Erst kürzlich konnte dieses System erfolgreich für die Aufklärung eines NS2B/NS3-Komplexes von ZIKV ohne Linkersequenz (bZiPro) genutzt werden (Zhang *et al.*, 2016). Der Kofaktor NS2B umschließt dabei die Proteasedomäne und bildet mit seinen N-terminalen 18 Aminosäuren (AS 49-67) ein β -Faltblatt, welches die korrekte Faltung der NS3 Protease unterstützt, während der C-terminale NS2B Anteil (AS 68-96) eine β -Haarnadel formt, die an der Ausbildung der

Substratbindetasche der NS3 Protease beteiligt ist (Zhang et al., 2016). Dieser Linker-freie NS2B/NS3 Komplex zeigte eine höhere enzymatische Aktivität verglichen mit den verschiedenen ZIKV SCP Komplexen (eZiPro bzw. gZiPro) und war in der Lage, den potenten Serinproteaseinhibitor BPTI zu binden (Phoo et al., 2016). Dies war den beiden ZIKV SCP Komplexen nicht möglich und es wurde vermutet, dass die Linkersequenzen am C-Terminus von NS2B sterische Hindernisse für einen Zugang zum aktiven Zentrum darstellen (Phoo et al., 2016). Eine weitere vielversprechende Möglichkeit zur Ermittlung der authentischen NS3/4A-Struktur bietet die *in vivo* Kristallisation, die es ermöglicht, die Struktur von Proteinkristallen aufzuklären, die in lebenden Zellen gebildet werden (Duszenko et al., 2015; Koopmann et al., 2012). Die Anwendung dieser Methode wäre von enormen Vorteil, da sie die Expression authentischer Proteinkomplexe (z.T. inklusive ihrer Transmembranregionen) in relevanten Kompartimenten der Zelle und deren spezifischer Membrenumgebung ermöglicht. Dies ist vorteilhaft im Hinblick auf die Arbeiten von Brass *et al.*, die verdeutlichten, dass sich die ER-Membranverankerung des NS3/4A-Komplexes auf die relative Orientierung der NS3 Helikasedomäne zur NS3 Proteasedomäne auswirkt (Brass et al., 2008). In diesem Zusammenhang ist ein weiterer interessanter Aspekt der in Abb. 5.1 dargestellten verschiedenen Protease/Kofaktor-Strukturen, dass die Oberflächeninteraktionen zwischen dem jeweiligen Kofaktor und der NS3-Proteaseoberfläche auf der von der Membran abwandten Seite stattfinden. Es besteht die Möglichkeit, dass die NS3/4A-Oberflächeinteraktion zur Ausbildung einer neuen Komplexoberfläche führt, die weitere Interaktionspartner durch spezifische Protein-Protein-Interaktionen rekrutiert.

Wegweisend für die vorliegende Arbeit war die erstmalige kristallographische Detektion der stabilen Oberflächeninteraktionen zwischen der NS3 Proteasedomäne und der NS4A Kink-Region durch die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen M132 (NS3) und L45 (NS4A) sowie Y47 (NS4A) (Abb. 4.1 C und Abb. 5.1 – CSFV, unten). Die Erkenntnis, dass mit der NS3-Aminosäure 132 (CSFV M132; BVDV V132) die kritische Determinante für die NS2-3-unabhängige Virionmorphogenese (Klemens et al., 2015) in diese Wechselwirkungen involviert ist, führte zur Hypothese, dass modulierte Protein-Protein-Interaktionen diesen Prozess unterstützen. Die in der CSFV SCP detektierten Interaktionen haben die Ausbildung einer kompakten Proteinkomplexformation zur Folge. Mechanistisch unterstützt diese Konformation die NS3-NS4A-Spaltung und die RNA-Replikation (Abb. 4.4 und Abb. 4.7), jedoch nicht die NS2-3-unabhängige Virionmorphogenese für die an der NS3 Aminosäureposition 132 ein Alanin als adaptive Mutation identifiziert werden konnte (Abb. 4.8 und Abb. 4.13) (Klemens et al., 2015). Die Daten der vorliegenden Arbeit unterstützen diese Annahme und zeigen, dass diese hydrophoben Interaktionen zwischen der NS3 Proteasedomäne und der NS4A Kink-Region zu einer kompakten Konformation von NS3/4A-Kink führen (Abb. 4.3), die in der RNA-Replikation benötigt wird (Abb. 4.6 und Abb. 4.7). Dass der für die NS2-3-unabhängige Virionmorphogenese kritische Aminosäureaustausch V132A die Reduktion der hydrophoben Seitenkette an dieser Position

beinhaltet, legte zugleich die Hypothese nahe, dass dieser Austausch die Oberflächeninteraktion zwischen der NS3 Proteasedomäne und der NS4A Kink-Region reduziert und dies der zugrundeliegende molekulare Mechanismus für die NS2-3-unabhängige Virionmorphogenese ist. Eine Abschwächung der NS3/4A-Kink Oberflächeninteraktion, vermittelt durch die Mutationen NS3 (V132A) oder NS4A (L45A oder Y47A), könnte u.a. die Ausbildung einer alternativen, offenen Konformation des NS3/4A-Komplexes zur Folge haben, die in Kombination mit NS2 (E440V) für die NS2-3-unabhängige Virionmorphogenese notwendig ist. Experimentell sind solche dynamischen Konformationsunterschiede von Proteinkomplexen relativ schwierig in Kristallstrukturen darzustellen, da offene Komplexkonformationen oft eine lokal ungeordnete Struktur zur Folge haben.

Unter diesen Gesichtspunkten wurde zunächst die Auswirkung von Mutationen auf die NS3/4A-Oberflächeninteraktion untersucht. Da sich NS4A über sein Zentralpeptid stabil in die N-terminale Domäne der NS3-Protease einlagert, war nicht zu erwarten, dass eine Mutation in der NS4A Kink-Region in der Dissoziation von NS3 und NS4A resultieren würde (Bartenschlager et al., 1995; Tautz et al., 2000). Aus diesem Grund wurde der TEV-Protease (TEV^{Pro})-Spaltungsassay als alternativer Weg zur Untersuchung der NS3/4A-Kink Oberflächeninteraktion entwickelt (Abb. 4.3). Die grundlegende Annahme war hierbei, dass eine offene Konformation von NS3/4A-Kink zur erhöhten Zugänglichkeit für die TEV-Protease an eine TEV-Spaltstelle führt, die an das Ende der NS4A Kink-Region fusioniert ist. Folglich müssten die TEV^{Pro}-Spaltungsraten in einem offene NS3/4A-Komplex erhöht sein (Abb. 4.3 A und B). Durch den TEV^{Pro}-Spaltungsassay konnten erfolgreich Mutationen an der NS3/4A-Kink Interaktionsoberfläche identifiziert werden, die sich, im Vergleich zum Wildtyp, destabilisierend auf diese Interaktion auswirkten und somit eine offenere NS3/4A-Komplexkonformation unterstützen (Abb. 4.3 C und D). Aufgrund des enzymatischen Charakters dieses Versuches wurde es möglich, die Stärke der Oberflächeninteraktion als Funktion der Zugänglichkeit der TEV-Spaltstelle darzustellen und damit die untersuchten Mutationen funktionell einzuschätzen (Abb. 4.3 C und D). Die Ergebnisse des TEV^{Pro}-Spaltungsassays unterstützten die Hypothese, dass eine starke Abschwächung der NS3/4A-Kink Oberflächeninteraktion zu einer erhöhten Flexibilität dieser Komplexe führt und eine vermehrt offene Konformation von NS3/4A-Kink induziert. Im Rahmen der in dieser Arbeit untersuchten Mutationen führte die NS4A-Doppelmutation L45-Y47-AA zur stärksten Abnahme der NS3/4A-Kink Oberflächeninteraktion (ca. 4,5-fach erhöhte NS4A₍₁₋₄₉₎-TEV-GST-Spaltungsraten im Vergleich zum WT, Abb. 4.3 D), was zu erwarten war, da hierbei die hydrophoben Interaktionen an zwei Positionen gleichzeitig reduziert werden (Abb. 4.3 C und D). Theoretisch sollte ein offener Komplex NS4A₍₁₋₄₉₎-TEV-GST Spaltungsraten bis zu 100% ermöglichen. Die Beobachtung, dass die ermittelten NS4A₍₁₋₄₉₎-TEV-GST-Spaltungsraten zwischen 10% (WT) und 45% (L45-Y47-AA) lagen, könnte auf das gleichzeitige Vorliegen der kompakten- und der offenen Konformation hindeuten. Es ist vorstellbar, dass diese in Abhängigkeit von der Stärke der Oberflächeninteraktion unterschiedlich effizient ineinander übergehen können. Es

muss jedoch in Betracht gezogen werden, dass die unvollständige Kotransfektion beider Plasmide eine weitere Ursache für ungespaltenes NS4A₍₁₋₄₉₎-TEV-GST sein könnte. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Kombination von den gewonnenen Strukturinformationen aus der CSFV SCP NS4A₃₇NS3 mit den funktionellen Untersuchungen dieser Arbeit sehr hilfreich für ein besseres molekulares Verständnis des NS3/4A-Komplexes war.

5.2 Bedeutung der NS3/4A-Kink Oberflächeninteraktion für die pestivirale RNA-Replikation und die NS2-3-unabhängige Virionmorphogenese

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass zwischen der Destabilisierung der NS3/4A-Kink Oberflächeninteraktion und der RNA-Replikationsfähigkeit eine inverse Korrelation besteht (vgl. Abb. 4.3 D mit Abb. 4.7 C). So zeigte der von Klemens *et al.* selektierte Aminosäureaustausch V132A im Vergleich zum Wildtyp im TEV^{pro}-Spaltungsassay nur eine gering erhöhte Spaltungsrate (1,5-fach) und Destabilisierung der NS3/4A-Kink Oberflächeninteraktion, die keinen detektierbaren Einfluss auf die RNA-Replikation hatte (Abb. 4.6 C und Abb. 4.7 C). Im Gegensatz dazu war die Abnahme der NS3/4A-Kink Oberflächeninteraktion durch die Mutationen L45A oder Y47A stärker, verbunden mit einer Beeinträchtigung der RNA-Replikation. Die NS4A-Doppelmutante wies den stärksten inhibierenden Einfluss auf die NS3/4A-Kink Interaktion auf und der resultierende NS3/4A-Komplex war nicht mehr in der Lage, die RNA-Replikation zu unterstützen.

Da ausgeschlossen werden konnte, dass die RNA-Replikationseffekte auf Defekten in der Polyproteinprozessierung beruhen (Abb. 4.4 C und 4.5 B), lässt sich schließen, dass die Abschwächung der NS3/4A-Kink Oberflächeninteraktion einen spezifischen Einfluss auf die RNA-Replikation besitzt. Eine attraktive mechanistische Schlussfolgerung aus diesen Beobachtungen ist, dass die offene Konformation des NS3/4A-Komplexes mit der Assemblierung der viralen Replikase interferiert. Folglich wäre eine kompakte Konformation von NS3/4A, d.h. die verstärkte Oberflächeninteraktion zwischen der NS3 Proteasedomäne und der NS4A Kink-Region, in der RNA-Replikation bevorzugt und somit die strukturelle Grundlage für den Zusammenbau der viralen Replikase. Diese Hypothese wird durch experimentelle Untersuchungen der HCV RNA-Replikation unterstützt, die dem C-terminalen Anteil von HCV NS4A eine kritische Rolle in der RNA-Replikation zuweisen konnten (Lindenbach *et al.*, 2007; Phan *et al.*, 2011). In verschiedenen HCV-Genotypen konnte gezeigt werden, dass sich Mutationen im C-terminalen Anteil von HCV NS4A auf die RNA-Replikation auswirken und diese z.T. inhibieren können (Lindenbach *et al.*, 2007; Phan *et al.*, 2011). Diese Mutationen bewirkten gleichzeitig eine starke Reduktion der HCV NS5A Hyperphosphorylierung (Lindenbach *et al.*, 2007), ein Prozess, der durch einen viralen Multiproteinkomplex bestehend aus NS3-NS5A ermöglicht wird (Koch *et al.*, 1999). Eine naheliegende Erklärung für diese Beobachtungen ist, dass der C-terminale Anteil von NS4A mit der

NS3-Proteaseoberfläche im NS3/4A-Komplex interagiert und diese funktionell wichtigen Interaktionen durch die NS4A-Mutationen gestört werden. Interessanterweise konnten Replikationsdefekte, die durch Austausch im C-terminalen Anteil von NS4A (z.B. D40A) ausgelöst wurden, durch verschiedene kompensatorische Mutationen auf der NS3-Proteaseoberfläche (z.B. R161L) ausgeglichen werden (Abb. 5.1 – HCV, unten) (Lindenbach et al., 2007). Diese funktionellen Kompensationen lassen vermuten, dass Oberflächeninteraktionen zwischen NS3 und NS4A teilweise wiederhergestellt wurden. Interessanterweise lässt sich im Vergleich der NS3/4A-Strukturen von CSFV und HCV erkennen, dass die Aminosäure D192 (CSFV) an einer ähnlichen Position lokalisiert ist wie R161 (HCV) (Abb. 5.1 – unten, vgl. CSFV und HCV). Diese Beobachtung könnte darauf hindeuten, dass CSFV NS3 D192 an Oberflächeninteraktionen von NS3 mit NS4A beteiligt ist. Auf eine essentielle Bedeutung von Oberflächenarealen der NS3 Protease für verschiedene Schritte des viralen Lebenszyklus von HCV weist u.a. die revers-genetische Studie von Isken *et al.* hin, in der ein hydrophobes Oberflächenareal auf der NS3 Proteasedomäne (NS3-Aminosäuren Y105, P115 und L127) identifiziert werden konnte (Abb. 5.1 – HCV, unten), das kritisch für die Assemblierung der viralen Replikase ist (Isken et al., 2015). Es konnte gezeigt werden, dass sich Mutationen in diesem Oberflächenareal, welche die hydrophoben Wechselwirkungen reduzieren oder aufheben, inhibierend auf die Assemblierung der viralen Replikase und die RNA-Replikation auswirken. Da diese Mutationen gleichzeitig die NS5A-Hyperphosphorylierung blockierten, wurde angenommen, dass diese Mutationen mit der Bildung von viralen Proteinkomplexen (bestehend aus NS3-NS5A und zellulären Faktoren) interferierten, welche die Grundlage für die Assemblierung einer funktionellen Replikase bilden. Interessanterweise konnten Isken *et al.* ebenfalls zeigen, dass dieses Oberflächenareal auch an der Aktivierung der HCV NS2-Protease beteiligt ist, welche vermutlich durch Oberflächeninteraktionen zwischen der NS2- und der NS3 Proteasedomäne innerhalb eines NS2-NS3 Vorläuferproteins vermittelt wird. Dadurch kommt dieser NS3-Oberfläche eine duale Funktion im hepaciviralen Lebenszyklus zu (Isken et al., 2015). Im Vergleich zur CSFV SCP Struktur der vorliegenden Arbeit ergeben diese HCV Daten interessante Parallelen, da die relative Lokalisierung dieses multifunktionellen Oberflächenareals auf der HCV NS3 Proteasedomäne mit der Lokalisation der Position 132 bei CSFV gut übereinstimmt (Abb. 5.1 – unten, vgl. CSFV und HCV). Ob der C-terminale Anteil von HCV-NS4A in die Bindung der hydrophoben NS3-Oberfläche involviert ist, kann aufgrund fehlender Strukturinformationen bisher noch nicht mit Sicherheit gesagt werden, ist jedoch im Hinblick auf die strukturellen- und funktionellen Parallelen zwischen CSFV/BVDV und HCV sehr gut denkbar (Abb. 5.1 – unten, vgl. CSFV und HCV). Darüber hinaus weisen mehrere Studien an HCV darauf hin, dass funktionelle Interaktionen zwischen NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B für die Assemblierung der viralen Replikase und die Genomreplikation wichtig sind (Blight, 2007; Lindenbach et al., 2007; Paredes and Blight, 2008; Paul et al., 2011; Phan et al., 2011). In

welcher Weise die einzelnen Proteine miteinander interagieren, um die viralen Replikasekomplexe auszubilden muss in zukünftigen Studien detailliert untersucht werden.

Die Tatsache, dass der Aminosäureaustausch V132A im NS3 durch die NS4A-Mutationen L45A und Y47A im Zusammenwirken mit NS2 E440V in der NS2-3-unabhängige Virionmorphogenese funktionell ersetzt werden kann (Abb. 4.8), lässt darauf schließen, dass die Abschwächung der hydrophoben NS3/4A-Kink Oberflächeninteraktion und folglich die Ausbildung einer offenen NS3/4A-Konformation die molekulare Grundvoraussetzung für die Funktionalität des NS3/4A Komplexes in der NS2-3-unabhängigen Virionmorphogenese ist. Diese Hypothese wird durch weitere funktionelle Beobachtungen unterstützt: So konnte z.B. durch eine Permutationsanalyse gezeigt werden, dass die Aminosäureidentität der NS3 Position 132 nicht absolut kritisch ist, da der Austausch V132S im monocistronischen Virus mit der NS2 Mutation E440V ebenfalls funktionell in der NS2-3-unabhängigen Virionmorphogenese war (Klemens et al., 2015). Es lässt sich vermuten, dass dieser Austausch zu lokal veränderten Konformationen des NS3/4A-Komplexes führen, die die NS2-3-unabhängigen Virionmorphogenese ermöglichen (Klemens et al., 2015). Diese Hypothese wird außerdem durch die Beobachtung bestätigt, dass die funktionelle Substitution von NS3 V132A durch NS4 L45A und Y47A in der NS2-3-unabhängigen Virionmorphogenese auch im bicistronischen Viruskontext, in dem NS2 und NS3 von unterschiedlichen ORFs translatiert werden, möglich ist (Abb. 4.10 und Tab. 4.1). Da diese stringente Trennung von NS2 und NS3 nicht dazu führt, dass diese die Fähigkeit verlieren sich zu einem verpackungskompetenten Proteinkomplex mit einer offenen NS3/4A-Konformation zusammenzulagern, unterstützt die obige Hypothese. Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass NS3/4A-Komplexe mit der NS4A-Doppelmutation L45-Y47-AA, die eine stark abgeschwächte NS3/4A-Kink Oberflächeninteraktionen aufweisen und in der RNA-Replikation inhibiert sind, im Verbund mit NS2 (E440V) *in trans* funktionell aktiv in der Verpackung sind (Abb. 4.13).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erweitern das funktionelle Verständnis der pestiviralen Virionmorphogenese. In diesem Zusammenhang konnte Moulin *et al.* belegen, dass NS2-3 nur im Komplex mit NS4A die pestivirale Virionmorphogenese ermöglicht. Im Gegensatz dazu ist NS2-3 allein oder ungespaltenes NS2-3-4A in der Virionmorphogenese nicht aktiv (Moulin et al., 2007). Interessanterweise ist NS2-3 in der Lage NS4A *in trans* zu rekrutieren, um in der Virionmorphogenese aktiv zu sein. Jedoch ist es NS2-3 nicht möglich, NS4A effizient aus aktiven Replikasekomplexen für die Verpackung zu rekrutieren (Moulin et al., 2007). Dies deutet drauf hin, dass der Virionmorphogenesekomplex und der Replikasekomplex spezialisierte multifunktionelle Proteinkomplexe darstellen, die spezifische Funktionen in dem jeweiligen Prozess erfüllen. Eine essentielle Funktion von NS4A besteht in der Verankerung des NS2-3/4A- und des NS3/4A-Komplexes in der ER-Membran analog zur Verankerung von HCV NS3/4A-Komplexen durch HCV NS4A in ER- und

äußeren Mitochondrienmembranen (Mottola et al., 2002; Nomura-Takigawa et al., 2006; Wolk et al., 2000). Möglicherweise ist NS4A im NS2-3/4A-Komplex über seine Transmembrandomäne (TM) für die Rekrutierung weiterer viraler- (z.B. Strukturproteine) oder zellulärer Faktoren verantwortlich bzw. unterstützt die Interaktion von NS2-3 mit p7 und E2. Eine solche Bedeutung konnte dem flaviviralen Proteasekofaktor NS2B für die Rekrutierung weiterer membrangebundener Nichtstrukturproteine (z.B. NS2A, NS4A und NS4B) zu einem NS2B/NS3 Komplex zugeordnet werden, jedoch ohne dass der zugrundeliegende Mechanismus für diese Interaktionen aufgeklärt werden konnte (Yu et al., 2013). Neben seiner Bedeutung für die korrekte Membranverankerung von NS3/4A-Komplexen konnte eine regulative Funktion für NS4A in der Koordinierung der HCV RNA-Replikation und Virionmorphogenese gezeigt werden (Phan et al., 2011). Dabei ist die Dimerisierung von NS4A über seine TM und die Ausbildung einer TM Dimer-Interaktionsfläche essentiell für diese Prozesse (Kohlway et al., 2014). Ob eine solche NS4A Dimerisierung bei Pestiviren existiert, ist bisher nicht bekannt. Eine interessante Hypothese wäre jedoch, dass NS3/4A-Komplexe der viralen Replikase mit verpackungskompetenten NS2-3/4A-Komplexen über die Dimerisierung durch die NS4A-TM in Kontakt stehen und die Prozesse der RNA-Replikation und der Virionmorphogenese durch Protein-Protein-Interaktionen auf diese Weise verknüpft sind. Studien hinsichtlich dieser mechanistischen Fragestellung würden von der Verwendung des Pestivirus-Systems profitieren, da sich das Verpackungsmodul NS2-3/4A von dem Replikationsmodul NS3/4A gut unterscheiden lässt. Dies ist ein deutlicher experimenteller Vorteil im Vergleich zum HCV-System, in dem der NS3/4A-Komplex für beide Prozesse essentiell ist (Lindenbach et al., 2013; Tautz et al., 2015).

Für HCV NS4A konnte sowohl dem N-terminalen als auch dem C-terminalen Anteil von NS4A eine kritische Funktion in der Virionmorphogenese nahegelegt werden (Kohlway et al., 2014; Phan et al., 2011). Es ist vorstellbar, dass der C-Terminus von HCV NS4A Interaktionen mit der NS3-Proteaseoberfläche eingeht (ähnlich zum CSFV NS4A in dieser Studie) und durch veränderte Protein-Protein-Interaktionen den Wechsel zwischen der RNA-Replikation und der Virionmorphogenese reguliert wird. In diesem Zusammenhang ist auffällig, dass sowohl im HCV NS4A das Zentralpeptid als auch die Kink-Region im Vergleich zum pestiviralen NS4A kürzer ist (Abb. 5.2). Ferner ist die HCV NS4A Kink-Region im Vergleich zum Pestivirus-NS4A weniger stark konserviert (Abb. 5.2). Die Tatsache, dass die HCV NS4A Kink-Region im Vergleich zur pestiviralen NS4A Kink-Region um 2 Aminosäuren verkürzt ist, lässt eine schwächere Ausprägung von Oberflächenkontakten als wahrscheinlich erscheinen. Weiterhin ist auffällig, dass sich in der HCV NS4A Kink-Region ein weiteres Prolin befindet, wodurch sich die Sequenz -PXXXP- ergibt. Da diese Sequenzabfolge keine definierte Sekundärstruktur bildet, ist es wahrscheinlich, dass sie eine Oberflächenloopstruktur oder Schleife ausbildet (MacArthur and Thornton, 1991). Insgesamt ist zu vermuten, dass die HCV NS4A Kink-Region eine höhere Flexibilität im Hinblick auf Oberflächeninteraktionen besitzt im Vergleich zum pestiviralen NS4A. Dies könnte ein

weiterer Grund dafür sein, warum die NS3/4A-Oberflächeninteraktion für HCV bisher noch nicht strukturell dargestellt werden konnte.

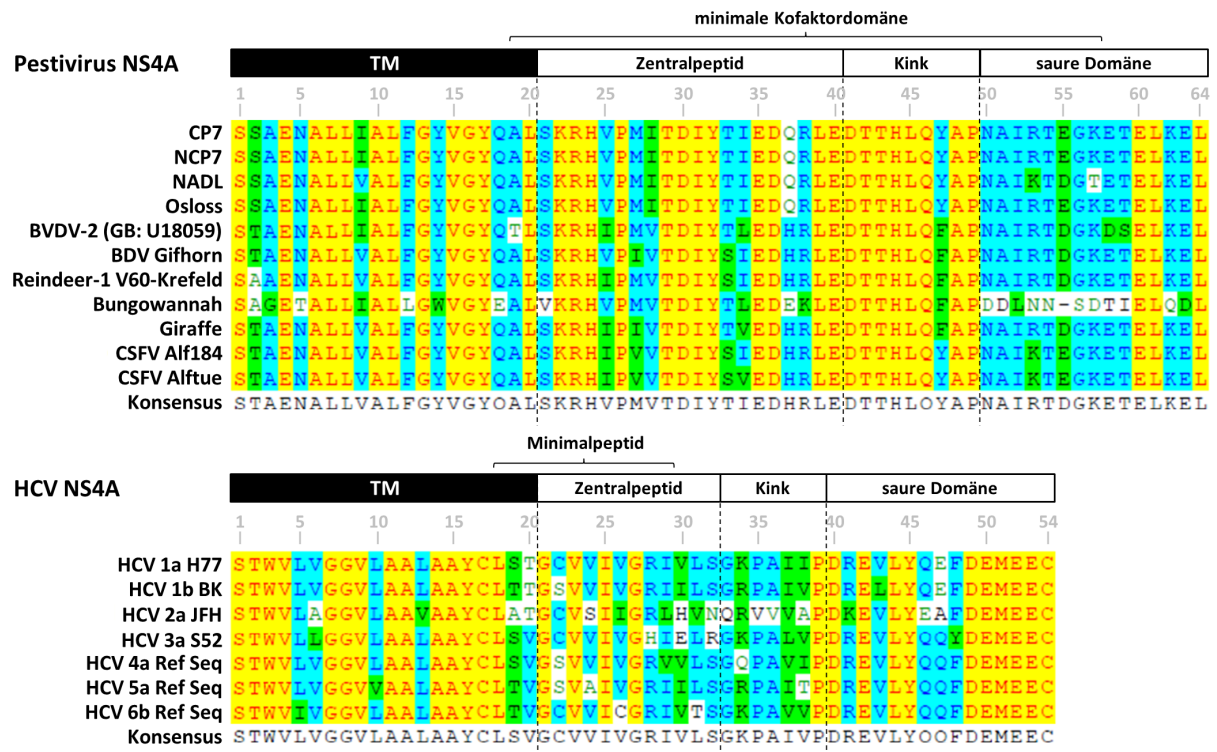


Abb. 5.2: Vergleich des pestiviralen- und hepaciviralen NS4A. (Oben) Schematische Darstellung und Sequenzvergleich des pestiviralen NS4A sowie dessen Einteilung in das Zentralpeptid, die Kink-Region und die saure Domäne. Die Einteilung wurde aufgrund der in dieser Arbeit durchgeführten Strukturanalysen und in Anlehnung an die Einteilung von HCV NS4A vorgenommen. Die experimentell bestimmte minimale Kofaktordomäne aus Tautz *et al.* 2000 ist gekennzeichnet. (Unten) Schematische Darstellung, Sequenzvergleich und Domänenorganisation von HCV NS4A. Das experimentell bestimmte Minimalpeptid aus Bartenschlager *et al.* 1995 ist gekennzeichnet. Farbschema: gelb (konserviert); blau (vorrangige AS an dieser Position); grün (gleiche AS-Klasse), weiß (keine Konservierung und verschiedene AS-Klasse).

Die Daten der vorliegenden Arbeit implizieren, dass die Modulation der Interaktion zwischen der NS3 Proteasedomäne und der NS4A Kink-Region einen molekularen Schalter darstellt, um Konformationsänderungen in NS3/4A-Komplexen zu induzieren, sodass diese entweder bevorzugt in der RNA-Replikation oder in der Virionmorphogenese genutzt werden können (Tab. 5.1).

Tabelle 5.1 Befähigung verschiedener NS3/4A-Komplexe bzw. des NS2-3/4A Komplexes zur Abschwächung der NS3/4A-Kink Interaktion, RNA-Replikation und pestiviralen Virusverpackung *in cis* oder *in trans*.

Proteinkomplex	NS3/4A-Kink Abschwächung	RNA-Replikation	Verpackung <i>in cis</i>	Verpackung <i>in trans</i>
NS3/4A	-	+++	-	-
NS3/4A (3/V132A)	+	+++	+	+
NS3/4A (4A/L45A)	++	+	+	+
NS3/4A (4A/Y47A)	+	++	+	+
NS3/4A (4A/L45-Y47-AA)	+++	-	n.d.	+
NS2-3/4A	+	-	+	+

n.d.: nicht durchgeführt

Inwieweit der Wechsel zwischen der offenen- und der geschlossenen Konformation von NS3/4A-Kink in der NS2-3-unabhängigen Virionmorphogenese dynamisch verläuft, durch einen alternierenden Wechsel zwischen beiden Formen oder ob ein gewisser Prozentsatz der NS3/4A-Komplexe in der einen bzw. in der anderen Konformation vorliegt, lässt sich aus den Untersuchungen dieser Arbeit nicht sagen. Dass virale Proteine bzw. Proteinkomplexe prinzipiell zum dynamischen Wechsel zwischen verschiedenen Konformationen befähigt sind, zeigen Studien zur Virionstruktur von unbehüllten Viren (Lewis et al., 1998) sowie von behüllten Viren, wie den Flaviviren (Kuhn et al., 2015).

Die Ausbildung unterschiedlicher Konformationen könnte die Rekrutierung weiterer spezifischer viraler- oder zellulärer Faktoren ermöglichen, wodurch in ihrer Proteinzusammensetzung verschiedene NS3/4A-Komplexe entweder in der RNA-Replikation oder in der Virionmorphogenese verwendet werden können. Damit der virale Lebenszyklus in Abwesenheit von ungespaltenem NS2-3 jedoch effizient ablaufen kann, muss ein Gleichgewicht zwischen den NS3/4A-Komplexen bestehen, die in der RNA-Replikation oder in der Virionmorphogenese aktiv sind. Das Verschieben dieses Gleichgewichts in die eine oder andere Richtung führt entweder zur Verpackungsunfähigkeit (NS3/4A Wildtyp – nur RNA-Replikation) oder zur Replikationsinkompetenz (NS3/4A mit 4A/L45-Y47-AA – nur verpackungsfähig) des entsprechenden Virus. Die kritische Bedeutung dieses Gleichgewichts wurde in dieser Arbeit u.a. bei der Verwendung des monocistronischen Virus mit den Mutationen 2/E440V und L45A im NS4A deutlich. Dieses Virus ist in der RNA-Replikation eingeschränkt und weist an frühen Zeitpunkten im Vergleich zu den Virusderivaten, die anstelle von 4A/L45A für 3/V132A oder 4A/Y47A kodieren, einen geringeren Virustiter auf (Abb. 4.9). Die Beobachtung, dass das monocistronische Virusderivat mit den Austauschen 2/E440V und 3/V132A effizient Virionen produzieren kann, obwohl es nur einen relativ geringen Anteil von verpackungsfähigen („offenen“) NS3/4A-Komplexen ausbildet (Abb. 4.3), deutet darauf hin, dass in der Zelle nur eine limitierte Anzahl an aktiven Verpackungskomplexen benötigt werden. Die kritische Bedeutung der Regulation zwischen der RNA-

Replikation und der Virionmorphogenese verdeutlichen u.a. die Arbeiten von Pietschmann *et al.* mit HCV, in denen sog. REM's (engl. *replication enhancing mutations*, REM) im NS3 und NS5A identifiziert werden konnten, die die RNA-Replikation verstärken, sich jedoch negativ auf die Produktion infektiöser Virionen auswirken (Pietschmann *et al.*, 2009). Diese Beobachtungen weisen ferner darauf hin, dass sowohl die RNA-Replikation als auch die Virionmorphogenese durch Protein-Protein-Interaktionen reguliert werden, die in spezialisierten Proteinkomplexen ausgebildet werden, die für den jeweiligen Prozess benötigt werden. Diese enge Kopplung zwischen der RNA-Replikation und der Virionmorphogenese konnte ebenfalls bei Flaviviren beobachtet werden (Apte-Sengupta *et al.*, 2014; Khromykh *et al.*, 2001).

Neben der Modulation der NS3/4A-Kink Oberflächeninteraktion ist eine weitere kritische Determinante für die NS2-3-unabhängige Virionmorphogenese die Mutation E440V in der NS2-Proteasedomäne (Klemens *et al.*, 2015). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte die essentielle Bedeutung dieser Mutation für die NS2-3-unabhängige Virionmorphogenese bestätigt werden (Abb. 4.11). Eine eindeutige Aussage über die genaue Funktion dieser Mutation lässt sich bisher nicht machen, da von NS2 oder dem ungespaltenen pestiviralen NS2-3 keine Strukturinformationen verfügbar sind. Aus früheren Studien ist jedoch bekannt, dass die strukturelle Integrität von NS2 essentiell für die NS2-3-unabhängige Virionmorphogenese ist, da die C-terminale Verkürzungen von NS2 um 10 AS und Mutationen im Zink-bindenden Motiv die Partikelbildung inhibieren (Lattwein *et al.*, 2012).

Für HCV ist bekannt, dass NS2 eine zentrale Schlüsselrolle in der Virionmorphogenese einnimmt, da es in der Lage ist sowohl mit den Strukturproteinen (z.B. E2) als auch mit den Nichtstrukturproteinen (p7, NS3 und zu einem geringeren Anteil mit NS5A) (Jirasko *et al.*, 2010) zu interagieren. Man geht davon aus, dass NS2 als Plattform für die Assemblierung von infektiösen Virionen fungiert und die viralen Glykoproteine an die Orte der Virusproduktion rekrutiert (Dentzer *et al.*, 2009; Jirasko *et al.*, 2008; Jirasko *et al.*, 2010; Jones *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2011; Phan *et al.*, 2009; Yi *et al.*, 2009). Eine für die HCV Virionmorphogenese essentielle Interaktion von NS2 besteht mit dem NS3-Protein (Jirasko *et al.*, 2010; Phan *et al.*, 2009). Ob diese Interaktion direkt ist oder über zelluläre- oder virale Faktoren vermittelt wird, ist bisher nicht eindeutig geklärt. In den Studien von Jirasko *et al.* und Phan *et al.* wurden Protein-Protein-Interaktionen zwischen NS2 und NS3 durch Mutationen in der NS2-Transmembrandomäne reduziert (Jirasko *et al.*, 2010). Weitere Protein-Protein Interaktionen, z.B. unter Beteiligung der NS2 und NS3 Proteasedomänen, erscheinen unter dem Gesichtspunkt möglich, dass eine hydrophobe Oberfläche auf der HCV NS3-Protease identifiziert werden konnte, die wichtig für die Aktivierung der NS2-Protease im NS2-NS3 Vorläuferprotein ist (Isken *et al.*, 2015). Basierend auf diesen Beobachtungen sind Interaktionen zwischen der NS2- und der NS3 Proteasedomäne im NS2-

NS3 Protein wahrscheinlich. Ob diese oder andere Oberflächeninteraktionen nach der NS2-NS3 Spaltung ebenfalls zur Virionmorphogenese beitragen, muss jedoch weiter untersucht werden. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Mutationen auf der NS3-Oberfläche, welche die NS2-Aktivierung im NS2-NS3 Kontext inhibierten, keinen detektierbaren Effekt auf Proteininteraktionen zwischen NS2 und NS3 in einem HCV NS2-IRES-NS3 Volllängevirus Derivat haben (Isken et al., 2015). Dass die HCV NS2 Proteasedomäne an essentiellen Interaktionen für eine effiziente Virionmorphogenese beteiligt ist, konnte experimentell belegt werden, da sich Aminosäureaustausche auf der NS2-Proteaseoberfläche inhibierend auf die Verpackung von HCV auswirkten (Dentzer et al., 2009). Da sich die für die NS2-3 unabhängige Virionmorphogenese essentielle Mutation NS2/E440V in der pestiviralen NS2-Protease domäne lokalisiert ist, wäre es denkbar, dass der Austausch E440V die Ausbildung von Protein-Protein-Interaktionen mit der NS3-Proteaseoberfläche ermöglicht, um die Abwesenheit von ungespaltenem NS2-3 in der Virionmorphogenese funktionell zu kompensieren.

Interessanterweise besitzt die von Isken *et al.* identifizierte NS3-Proteaseoberfläche, bestehend aus Y105, P115 und L127 eine duale Funktion, da sie sowohl essentiell für die NS2-Aktivierung und kritisch für die Assemblierung der viralen Replikase ist (Isken et al., 2015). Da diese hydrophobe NS3-Oberfläche von HCV in der NS3/4A-Struktur ähnlich lokalisiert ist, wie die CSFV NS3/4A-Kink Interaktionsoberfläche (Abb. 5.1), lässt vermuten, dass die CSFV NS3-Oberfläche um Aminosäure M132, eine zu HCV-vergleichbare duale Funktion in der pestiviralen NS2-3-unabhängigen Virionmorphogenese besitzt. Es ist denkbar, dass diese NS3-Oberfläche Protein Interaktionen mit der NS4A Kink-Region während der RNA-Replikation und mit NS2 (mit der Mutation E440V) in der NS2-3-unabhängigen Virionmorphogenese eingeht, um diese Prozesse funktionell zu unterstützen. Die ersten vielversprechenden Interaktionsstudien dahingehend wurden bereits von Schlotthauer F. durchgeführt und deuten auf die Existenz solcher NS2/NS3-Interaktionen hin (Schlotthauer, 2017). Es sind jedoch umfassendere Interaktionsstudien in diesem Zusammenhang notwendig, um den Beitrag von 2/E440V in diesem Kontext genau zu bestimmen.

Die Identifikation der Aminosäureaustausche 2/E440V und 3/V132A, welche die Virionmorphogenese in Abwesenheit von ungespaltenem NS2-3 ermöglichen, war wegweisend für die vorliegende Arbeit und das Verständnis des zugrundeliegenden Mechanismus. Dennoch benötigen Wildtyp-Pestiviren ungespaltenes NS2-3 in Komplex mit NS4A für die Verpackung infektiöser Virionen (Agapov et al., 2004; Moulin et al., 2007). Dadurch stellte sich die Frage, ob der NS2-3/4A-Komplex eine offene Konformation hinsichtlich der NS3/4A-Kink Oberflächeninteraktion einnehmen kann. Mithilfe des TEV^{Pro}-Spaltungsassays konnte für den NS2-3/4A-Komplex im Vergleich zum NS3/4A-Komplex eine erhöhte Zugänglichkeit der TEV-Spaltstelle für die TEV-Protease nachgewiesen werden (Abb. 4.14). Aus diesen Beobachtungen lässt sich schlussfolgern, dass NS2 im NS2-3/4A-Komplex die

Oberflächeninteraktion zwischen der NS3 Proteasedomäne und der NS4A Kink-Region dahingehend moduliert, dass diese Interaktion abgeschwächt wird und sich eine offenere Konformation ausbilden kann. Dies resultiert in der Bildung eines verpackungskompetenten Proteinkomplexes. Dieses Modell wird u.a. dadurch unterstützt, dass der N-Terminus von NS3 in unmittelbarer Nähe zur NS3/4A-Kink Interaktionsoberfläche liegt (Abb. 4.1 B und C sowie 5.1). Im Kontext eines NS2-3/4A-Komplexes könnte somit der C-terminale Anteil von NS2 durch seine Lokalisation in direkter Nähe zur NS3/4A-Kink Interaktionsoberfläche diese Oberflächeninteraktion sterisch beeinflussen bzw. durch eine direkte Interaktion zwischen NS2 und NS3 an dieser Oberfläche die Anlagerung des C-terminalen Anteils des NS4A-Kofaktors an die NS3 Protease behindern. Diese Hypothese einer sequentiellen Abfolge von funktionellen Protein-Protein Interaktionen wird durch die Arbeiten von Isken *et al.* unterstützt, in denen experimentell belegt werden konnte; dass die Interaktion zwischen NS2 und NS3 im ungespaltenen NS2-NS3 Vorläuferprotein durch die Aktivierung der NS2-Protease und die NS2-3-Spaltung aufgelöst werden muss, um Interaktionen von NS-Proteinen mit dem NS3 zu ermöglichen, die zur NS5A Hyperphosphorylierung (Interaktionen von NS3-5A) und letztlich zum funktionellen Replikasezusammenbau (Interaktionen von NS3-5B) führen (Isken et al., 2015). Die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit und die Studie von Isken *et al.* lassen für beide Genera vermuten, dass die Anwesenheit von NS2 im NS2-3/4A-Komplex mit einer strukturellen Veränderung einhergeht, welche die Assemblierung der viralen Replikase unterbindet. Weitere Schlussfolgerungen in diesem Zusammenhang benötigen jedoch die Unterstützung durch eine NS2-3 Kristallstruktur.

Aus den Erkenntnissen dieser Arbeit konnte ein Modell zur Regulation der RNA-Replikation und Virionmorphogenese von Pestiviren in An- und Abwesenheit von ungespaltenem NS2-3 entwickelt werden (Abb. 5.3).

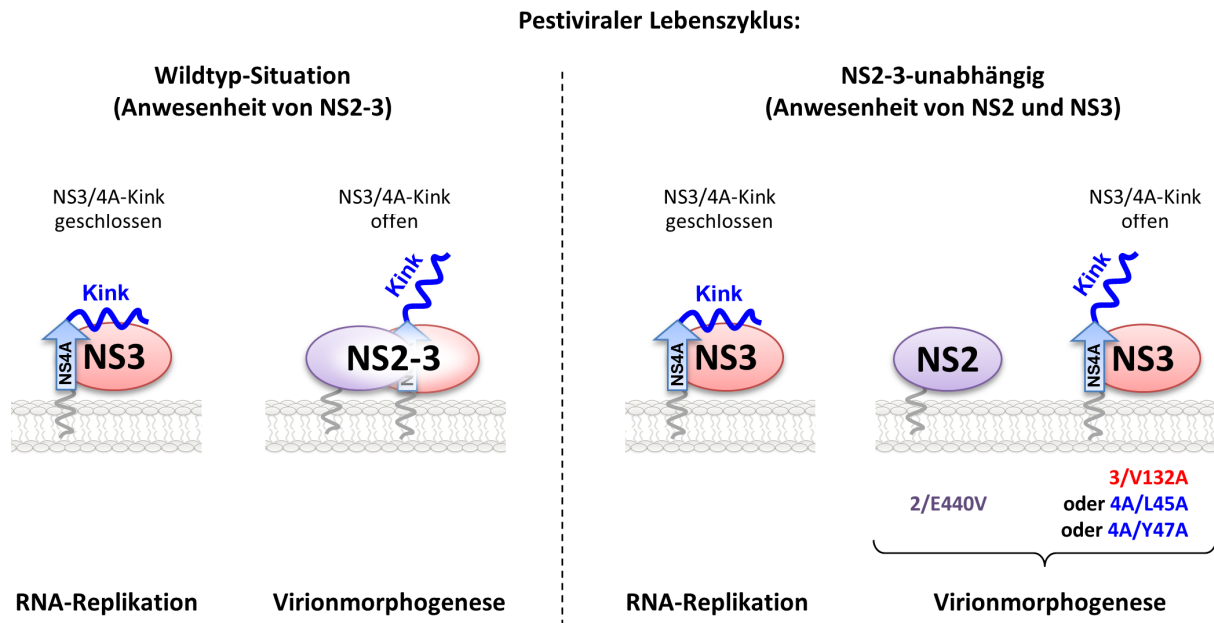


Abb. 5.3: Modell zur pestiviralen RNA-Replikation und Virionmorphogenese in An- und Abwesenheit von ungespaltenem NS2-3. (Links: Wildtyp-Situation) Im pestiviralen Lebenszyklus wird der NS3/4A-Komplex essentiell für die RNA-Replikation benötigt. In der Virionmorphogenese ist hingegen nur der NS2-3/4A-Komplex funktionell aktiv. Während der NS3/4A-Komplex durch die stabile Oberflächeninteraktion zwischen der NS3 Proteasedomäne und der NS4A Kink-Region eine kompakte Konformation ausbildet (NS3/4A-Kink geschlossen), sorgt der NS2-Anteil innerhalb des NS2-3/4A-Komplexes für eine Reduktion bzw. Veränderung dieser Interaktion, was in einer offenen Komplexkonformation resultiert, die für die Virionmorphogenese benötigt wird (NS3/4A-Kink offen). NS3 (rot), NS2 (violett), ungespaltenes NS2-3 (hell violett-rot), NS4A (blau), das NS4A-Zentralpeptid (blauer Pfeil) und die NS4A Kink-Region (blaue Schlangenlinie - Kink) sind eingezeichnet. (Rechts: NS2-3-unabhängig) In Abwesenheit von ungespaltenem NS2-3 werden für die Virionmorphogenese kompensatorische Mutationen in der NS2 Proteasedomäne (E440V) und im NS3/4A-Komplex benötigt. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Austauschmutationen V132A (NS3), L45A und Y47A (NS4A) zur Konformationsänderung an der NS3/4A-Kink Interaktionsoberfläche führen, sodass der NS3/4A-Komplex eine offene Konformation einnimmt, die für die NS2-3-unabhängige Virionmorphogenese essentiell ist. Ferner deuten die Untersuchungen darauf hin, dass eine kompakte Konformation in der RNA-Replikation favorisiert wird. Folglich ermöglicht die Modulation der NS3/4A-Kink Oberflächeninteraktion den Wechsel zwischen der RNA-Replikation und der Virionmorphogenese.

5.3 Ausblick

Die Identifikation alternativer NS3/4A-Komplexkonformationen, bedingt durch veränderte Protein-Protein-Interaktion zwischen der NS3 Proteasedomäne und der NS4A Kink-Region, war essentiell für die mechanistische Aufklärung der NS2-3-unabhängigen Virionmorphogenese und ist richtungweisend für das Verständnis der Modularität und Multifunktionalität viraler Proteinkomplexe im pestiviralen Lebenszyklus. Die Erkenntnis, dass eine kompakte NS3/4A-Konformation für die RNA-Replikation benötigt wird, während eine offene NS3/4A-Komplexkonformation die NS2-3-unabhängige Virionmorphogenese unterstützt, ist für das Verständnis der Zusammensetzung von replikations- bzw. verpackungskompetenten viralen Proteinkomplexen von großer Bedeutung. Die detaillierte Untersuchung der NS2-3-unabhängigen Virionmorphogenese sollte die weitere Charakterisierung spezialisierter multifunktionaler Proteinkomplexe ermöglichen, die an der RNA-Replikation bzw. der

Virionmorphogenese beteiligt sind und helfen, deren spezifische Funktionen in dem jeweiligen Prozess und ihre Relevanz für den pestiviralen Lebenszyklus zu ergründen. Da sich die Interaktion zwischen der NS3 Proteasedomäne und dem C-terminalen Anteil von NS4A möglicherweise nicht nur auf die NS4A Kink-Region beschränkt, sondern eventuell die saure Domäne von NS4A einschließt, sind Studien zur Aufklärung der authentischen Struktur des pestiviralen NS3/4A-Komplexes anzustreben. Die Identifikation weiterer Kontaktpunkte zwischen der NS3 Proteasedomäne und dem C-terminalen Anteil NS4A würde die detaillierte Kartierung der NS3/4A-Interaktionsoberfläche ermöglichen. Diese Studien könnten von der Verwendung des pDuet-Vektor/Expressionssystems profitieren, da dieses System bereits erfolgreich für die Aufklärung der Interaktionen der zytoplasmatischen Anteile eines ZIKV NS2B/NS3-Komplexes genutzt werden konnte (Zhang et al., 2016). Da der C-terminale Anteil von NS4A und dessen Interaktion mit der NS3 Proteasedomäne kritisch für die RNA-Replikation und die Virionmorphogenese ist, sollte die weitere Charakterisierung dieses Bereiches hinsichtlich seiner Beteiligung an diesen Prozessen untersucht werden. Weiterführende Mutagenesestudien mit Fokus auf die NS4A Kink-Region und die saure C-terminale NS4A Domäne ermöglichen die ausführliche Charakterisierung dieser Teilbereiche hinsichtlich ihrer Beteiligung an der RNA-Replikation bzw. der Virionmorphogenese. In diesem Zusammenhang könnte mithilfe des *trans*-Komplementationsassays außerdem untersucht werden, inwiefern Teilbereiche/Domänen von NS4A essentiell in der pestiviralen Virionmorphogenese benötigt werden. Von besonderem Interesse wäre hierbei, ob die NS4A-TM für die erfolgreiche *trans*-Komplementation eines verpackungsinkompetenten Virus benötigt wird. In diesem Zusammenhang ist die Frage interessant, ob diese NS4A TM-Domäne Protein-Protein-Interaktionen zwischen dem verpackungskompetenten NS2-3/4A-Komplex und dem replikationsaktiven NS3/4A-Komplex ermöglicht. Erkenntnisgewinne diesbezüglich wären besonders interessant, da sie Aufschluss darüber geben würden, ob in Pestivirus-infizierten Zellen Replikationskomplexe mit Verpackungskomplexen über die NS4A-TM in Kontakt stehen.

Die Aufklärung der Bedeutung des Austausches E440V in der NS2 Proteasedomäne für die NS2-3-unabhängige Virionmorphogenese ist ebenfalls von hohem Interesse, um das molekulare Verständnis dieses Prozesses weiter zu vertiefen. In der vorliegenden Arbeit wurde nahegelegt, dass durch die reduzierte Oberflächeninteraktion zwischen der NS3 Proteasedomäne und der NS4A Kink-Region ein hydrophobes Oberflächenareal auf der NS3 Proteasedomäne freilegt wird, welches die Aminosäureposition 132 einschließt. Eine attraktive Hypothese dieser Arbeit ist, dass diese hydrophobe NS3-Oberfläche an der Bindung von NS2 beteiligt ist, um NS2/NS3 Interaktionen einzugehen, die in der Lage sind, die Funktion von ungespaltenem NS2-3 zu kompensieren. Es ist vorstellbar, dass die Mutation 2/E440V an dieser Interaktion beteiligt ist. Um diese Hypothese detailliert zu untersuchen sollten weitergehende Protein-Protein-Interaktionsstudien durchgeführt werden.

Des Weiteren ist es interessant zu untersuchen, ob sich die Erkenntnisse dieser Arbeit auch auf andere Pestiviren (z.B. CSFV) funktionell übertragen lassen. Dies würde zu einem besseren molekularen Verständnis der pestiviralen Virionmorphogenese führen. Die Adaptation anderer Pestiviren an die NS2-3-unabhängige Virionmorphogenese birgt außerdem das Potential weitere virale- oder zelluläre Interaktionspartner zu identifizieren, die an diesen Prozessen beteiligt sind, wodurch die detaillierte Charakterisierung der involvierten Proteinkomplexe ermöglicht werden würde.

6. Literaturverzeichnis

- Aberle, D., Muhle-Goll, C., Bürck, J., Wolf, M., Reisser, S., Luy, B., Wenzel, W., Ulrich, A.S., and Meyers, G. (2014). Structure of the membrane anchor of pestivirus glycoprotein E(rns), a long tilted amphipathic helix. *PLoS Pathog* 10, e1003973.
- Adams, N.J., Prescott, L.E., Jarvis, L.M., Lewis, J.C., McClure, M.O., Smith, D.B., and Simmonds, P. (1998). Detection in chimpanzees of a novel flavivirus related to GB virus-C/hepatitis G virus. *J Gen Virol* 79 (Pt 8), 1871-1877.
- Agapov, E.V., Murray, C.L., Frolov, I., Qu, L., Myers, T.M., and Rice, C.M. (2004). Uncleaved NS2-3 Is Required for Production of Infectious Bovine Viral Diarrhea Virus. *J Virol* 78, 2414-2425.
- Agnello, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G.B., and Zhang, Q.X. (1999). Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12766-12771.
- Ansari, I.H., Chen, L.M., Liang, D., Gil, L.H., Zhong, W., and Donis, R.O. (2004). Involvement of a bovine viral diarrhea virus NS5B locus in virion assembly. *J Virol* 78, 9612-9623.
- Appel, N., Zayas, M., Miller, S., Krijnse-Locker, J., Schaller, T., Friebe, P., Kallis, S., Engel, U., and Bartenschlager, R. (2008). Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathog* 4, e1000035.
- Apte-Sengupta, S., Sirohi, D., and Kuhn, R.J. (2014). Coupling of replication and assembly in flaviviruses. *Current opinion in virology* 9, 134-142.
- Assenberg, R., Mastrangelo, E., Walter, T.S., Verma, A., Milani, M., Owens, R.J., Stuart, D.I., Grimes, J.M., and Mancini, E.J. (2009). Crystal structure of a novel conformational state of the flavivirus NS3 protein: implications for polyprotein processing and viral replication. *J Virol* 83, 12895-12906.
- Avalos-Ramirez, R., Orlich, M., Thiel, H.-J., and Becher, P. (2001). Evidence for the presence of two novel pestivirus species. *Virology* 286, 456-465.
- Baechlein, C., Fischer, N., Grundhoff, A., Alawi, M., Indenbirken, D., Postel, A., Baron, A.L., Offinger, J., Becker, K., Beineke, A., *et al.* (2015). Identification of a Novel Hepacivirus in Domestic Cattle from Germany. *J Virol* 89, 7007-7015.
- Baechlein, C., Grundhoff, A., Fischer, N., Alawi, M., Hoeltig, D., Waldmann, K.H., and Becher, P. (2016). Pegivirus Infection in Domestic Pigs, Germany. *Emerging infectious diseases* 22, 1312-1314.
- Bailey, A.L., Lauck, M., Ghai, R.R., Nelson, C.W., Heimbruch, K., Hughes, A.L., Goldberg, T.L., Kuhn, J.H., Jasinska, A.J., Freimer, N.B., *et al.* (2016). Arteriviruses, Pegiviruses, and Lentiviruses Are Common among Wild African Monkeys. *J Virol* 90, 6724-6737.
- Baker, J.C. (1987). Bovine viral diarrhea virus: A review. *J Am Vet Med Assoc* 190, 1449-1458.
- Baker, R.T., Tobias, J.W., and Varshavsky, A. (1992). Ubiquitin-specific proteases of *Saccharomyces cerevisiae*. Cloning of UBP2 and UBP3, and functional analysis of the UBP gene family. *The Journal of biological chemistry* 267, 23364-23375.
- Bartenschlager, R., Lohmann, V., Wilkinson, T., and Koch, J.O. (1995). Complex formation between the NS3 serine-type proteinase of the hepatitis C virus and NS4A and its importance for polyprotein maturation. *J Virol* 69, 7519-7528.
- Bauhofer, O., Summerfield, A., Sakoda, Y., Tratschin, J.D., Hofmann, M.A., and Ruggli, N. (2007). Classical swine fever virus Npro interacts with interferon regulatory factor 3 and induces its proteasomal degradation. *J Virol* 81, 3087-3096.

- Bazan, J.F., and Fletterick, R.J. (1989). Detection of a trypsin-like serine protease domain in flaviviruses and pestiviruses. *Virology* 171, 637-639.
- Becher, P., Orlich, M., Konig, M., and Thiel, H.-J. (1999). Nonhomologous RNA recombination in bovine viral diarrhoea virus: molecular characterization of a variety of subgenomic RNAs isolated during an outbreak of fatal mucosal disease. *J Virol* 73, 5646-5653.
- Becher, P., Orlich, M., Shannon, A.D., Horner, G., Konig, M., and Thiel, H.-J. (1997). Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. *J Gen Virol* 78, 1357-1366.
- Becher, P., Orlich, M., and Thiel, H.-J. (1998). Complete genomic sequence of border disease virus, a pestivirus from sheep. *J Virol* 72, 5165-5173.
- Becher, P., Orlich, M., and Thiel, H.-J. (2001). RNA recombination between persisting pestivirus and a vaccine strain: generation of cytopathogenic virus and induction of lethal disease. *J Virol* 75, 6256-6264.
- Becher, P., Schmeiser, S., Oguzoglu, T.C., and Postel, A. (2012). Complete genome sequence of a novel pestivirus from sheep. *J Virol* 86, 11412.
- Becher, P., Shannon, A.D., Tautz, N., and Thiel, H.-J. (1994). Molecular characterization of border disease virus, a pestivirus from sheep. *Virology* 198, 542-551.
- Becher, P., and Tautz, N. (2011). RNA recombination in pestiviruses: Cellular RNA sequences in viral genomes highlight the role of host factors for viral persistence and lethal disease. *RNA Biol* 8, 216-224.
- Behrens, S.E., Grassmann, C.W., Thiel, H.J., Meyers, G., and Tautz, N. (1998). Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon. *J Virol* 72, 2364-2372.
- Bertolotti-Ciarlet, A., White, L.J., Chen, R., Prasad, B.V.V., and Estes, M.K. (2002). Structural requirements for the assembly of Norwalk virus-like particles. *Journal of virology* 76, 4044-4055.
- Bielefeldt-Ohmann, H., and Bloch, B. (1982). Electron microscopic studies of bovine viral diarrhoea virus in tissues of diseased calves and in cell cultures. *Archives of virology* 71, 57-74.
- Bintintan, I., and Meyers, G. (2010). A new type of signal peptidase cleavage site identified in an RNA virus polyprotein. *J Biol Chem* 285, 8572-8584.
- Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Biswas, A., Treadaway, J., and Tellinghuisen, T.L. (2016). Interaction between Nonstructural Proteins NS4B and NS5A Is Essential for Proper NS5A Localization and Hepatitis C Virus RNA Replication. *J Virol* 90, 7205-7218.
- Blight, K.J. (2007). Allelic variation in the hepatitis C virus NS4B protein dramatically influences RNA replication. *J Virol* 81, 5724-5736.
- Boson, B., Granio, O., Bartenschlager, R., and Cosset, F.-L. (2011). A concerted action of hepatitis C virus p7 and nonstructural protein 2 regulates core localization at the endoplasmic reticulum and virus assembly. *PLoS pathogens* 7, e1002144.
- Brass, V., Berke, J.M., Montserret, R., Blum, H.E., Penin, F., and Moradpour, D. (2008). Structural determinants for membrane association and dynamic organization of the hepatitis C virus NS3-4A complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 14545-14550.
- Brass, V., Bieck, E., Montserret, R., Wölk, B., Hellings, J.A., Blum, H.E., Penin, F., and Moradpour, D. (2002). An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *The Journal of biological chemistry* 277, 8130-8139.

- Brass, V., Pal, Z., Sapay, N., Deleage, G., Blum, H.E., Penin, F., and Moradpour, D. (2007). Conserved determinants for membrane association of nonstructural protein 5A from hepatitis C virus and related viruses. *J Virol* 81, 2745-2757.
- Brock, K.V., Deng, R., and Riblet, S.M. (1992). Nucleotide sequencing of 5' and 3' termini of bovine viral diarrhea virus by RNA ligation and PCR. *J Virol Methods* 38, 39-46.
- Brownlie, J., and Clarke, M.C. (1993). Experimental and spontaneous mucosal disease of cattle: a validation of Koch's postulates in the definition of pathogenesis. *Intervirology* 35, 51-59.
- Burrack, S., Aberle, D., Burck, J., Ulrich, A.S., and Meyers, G. (2012). A new type of intracellular retention signal identified in a pestivirus structural glycoprotein. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 26, 3292-3305.
- Callens, N., Brugger, B., Bonnafous, P., Drobecq, H., Gerl, M.J., Krey, T., Roman-Sosa, G., Rumenapf, T., Lambert, O., Dubuisson, J., *et al.* (2016). Morphology and Molecular Composition of Purified Bovine Viral Diarrhea Virus Envelope. *PLoS Pathog* 12, e1005476.
- Carrasco, L. (1995). Modification of membrane permeability by animal viruses. *Advances in virus research* 45, 61-112.
- Cattaneo, R. (2004). Four viruses, two bacteria, and one receptor: membrane cofactor protein (CD46) as pathogens' magnet. *J Virol* 78, 4385-4388.
- Chambers, T.J., Nestorovicz, A., Amberg, S.M., and Rice, C.M. (1993). Mutagenesis of the yellow fever virus NS2B protein: effects on proteolytic processing, NS2B-NS3 complex formation, and viral replication. *J Virol* 67, 6797-6807.
- Chandriani, S., Skewes-Cox, P., Zhong, W., Ganem, D.E., Divers, T.J., Van Blaricum, A.J., Tennant, B.C., and Kistler, A.L. (2013). Identification of a previously undescribed divergent virus from the Flaviviridae family in an outbreak of equine serum hepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E1407-1415.
- Chen, Y., Xiao, J., Sheng, C., Wang, J., Jia, L., Zhi, Y., Li, G., Chen, J., and Xiao, M. (2012). Classical swine fever virus NS5A regulates viral RNA replication through binding to NS5B and 3'UTR. *Virology* 432, 376-388.
- Chon, S.K., Perez, D.R., and Donis, R.O. (1998). Genetic analysis of the internal ribosome entry segment of bovine viral diarrhea virus. *Virology* 251, 370-382.
- Collett, M.S., Anderson, D.K., and Retzel, E. (1988a). Comparisons of the Pestivirus bovine viral diarrhoea virus with members of the Flaviviridae. *J Gen Virol* 69, 2637-2643.
- Collett, M.S., Larson, R., Belzer, S.K., and Retzel, E. (1988b). Proteins encoded by bovine viral diarrhea virus: the genomic organization of a pestivirus. *Virology* 165, 200-208.
- Collett, M.S., Wiskerchen, M.A., Welniak, E., and Belzer, S.K. (1991). Bovine viral diarrhea virus genomic organization. *Arch Virol Suppl.* 3, 19-27.
- Corapi, W.V., Donis, R.O., and Dubovi, E.J. (1988). Monoclonal antibody analyses of cytopathic and noncytopathic viruses from fatal bovine viral diarrhea infections. *J Virol* 62, 2823-2827.
- Corapi, W.V., Donis, R.O., and Dubovi, E.J. (1990). Characterization of a panel of monoclonal antibodies and their use in the study of the antigenic diversity of bovine viral diarrhea virus. *Am J Vet Res* 51, 1388-1394.
- Corman, V.M., Grundhoff, A., Baechlein, C., Fischer, N., Gmyl, A., Wollny, R., Dei, D., Ritz, D., Binger, T., Adankwah, E., *et al.* (2015). Highly divergent hepaciviruses from African cattle. *J Virol* 89, 5876-5882.
- Counihan, N.A., Rawlinson, S.M., and Lindenbach, B.D. (2011). Trafficking of hepatitis C virus core protein during virus particle assembly. *PLoS Pathog* 7, e1002302.

- de Moerlooze, L., Lecomte, C., Brown-Shimmer, S., Schmetz, D., Guiot, C., Vandenberg, D., Allaer, D., Rossius, M., Chappuis, G., Dina, D., *et al.* (1993). Nucleotide sequence of the bovine viral diarrhoea virus Osloss strain: comparison with related viruses and identification of specific DNA probes in the 5' untranslated region. *J Gen Virol* 74, 1433-1438.
- Deng, R., and Brock, K.V. (1992). Molecular cloning and nucleotide sequence of a pestivirus genome, noncytopathogenic bovine viral diarrhoea virus strain SD-1. *Virology* 191, 867-879.
- Dentzer, T.G., Lorenz, I.C., Evans, M.J., and Rice, C.M. (2009). Determinants of the hepatitis C virus nonstructural protein 2 protease domain required for production of infectious virus. *J Virol* 83, 12702-12713.
- Deregt, D., and Loewen, K.G. (1995). Bovine viral diarrhoea virus: biotypes and disease. *Can Vet J* 36, 371-378.
- Dimitrova, M., Imbert, I., Kieny, M.P., and Schuster, C. (2003). Protein-Protein Interactions between Hepatitis C Virus Nonstructural Proteins. *Journal of Virology* 77, 5401-5414.
- Drexler, J.F., Corman, V.M., Muller, M.A., Lukashev, A.N., Gmyl, A., Coutard, B., Adam, A., Ritz, D., Leijten, L.M., van Riel, D., *et al.* (2013). Evidence for novel hepaciviruses in rodents. *PLoS Pathog* 9, e1003438.
- Droll, D.A., Krishna Murthy, H.M., and Chambers, T.J. (2000). Yellow fever virus NS2B-NS3 protease: charged-to-alanine mutagenesis and deletion analysis define regions important for protease complex formation and function. *Virology* 275, 335-347.
- Dubrau, D., Tortorici, M.A., Rey, F.A., and Tautz, N. (2017). A positive-strand RNA virus uses alternative protein-protein interactions within a viral protease/cofactor complex to switch between RNA replication and virion morphogenesis. *PLoS Pathog* 13, e1006134.
- Duszenko, M., Redecke, L., Mudogo, C.N., Sommer, B.P., Mogk, S., Oberthuer, D., and Betzel, C. (2015). In vivo protein crystallization in combination with highly brilliant radiation sources offers novel opportunities for the structural analysis of post-translationally modified eukaryotic proteins. *Acta crystallographica Section F, Structural biology communications* 71, 929-937.
- Egger, D., Wolk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H.E., Moradpour, D., and Bienz, K. (2002). Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* 76, 5974-5984.
- Einav, S., Elazar, M., Danieli, T., and Glenn, J.S. (2004). A nucleotide binding motif in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates HCV RNA replication. *J Virol* 78, 11288-11295.
- El Omari, K., Iourin, O., Harlos, K., Grimes, J.M., and Stuart, D.I. (2013). Structure of a pestivirus envelope glycoprotein E2 clarifies its role in cell entry. *Cell reports* 3, 30-35.
- Elazar, M., Cheong, K.H., Liu, P., Greenberg, H.B., Rice, C.M., and Glenn, J.S. (2003). Amphipathic helix-dependent localization of NS5A mediates hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 77, 6055-6061.
- Elbers, K., Tautz, N., Becher, P., Rumenapf, T., and Thiel, H.-J. (1996). Processing in the Pestivirus E2-NS2 region: identification of the nonstructural proteins p7 and E2p7. *J Virol* 70, 4131-4135.
- Ferlenghi, I., Clarke, M., Ruttan, T., Allison, S.L., Schalich, J., Heinz, F.X., Harrison, S.C., Rey, F.A., and Fuller, S.D. (2001). Molecular organization of a recombinant subviral particle from tick-borne encephalitis virus. *Molecular cell* 7, 593-602.
- Fetzer, C., Tews, B.A., and Meyers, G. (2005). The carboxy-terminal sequence of the pestivirus glycoprotein E(rns) represents an unusual type of membrane anchor. *J Virol* 79, 11901-11913.
- Finley, D., Bartel, B., and Varshavsky, A. (1989). The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis. *Nature* 338, 394-401.

- Finley, D., Ozkaynak, E., and Varshavsky, A. (1987). The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation, and other stresses. *Cell* 48, 1035-1046.
- Firth, C., Bhat, M., Firth, M.A., Williams, S.H., Frye, M.J., Simmonds, P., Conte, J.M., Ng, J., Garcia, J., Bhuvu, N.P., *et al.* (2014). Detection of zoonotic pathogens and characterization of novel viruses carried by commensal *Rattus norvegicus* in New York City. *mBio* 5, e01933-01914.
- Fletcher, S.P., and Jackson, R.J. (2002). Pestivirus internal ribosome entry site (IRES) structure and function: elements in the 5' untranslated region important for IRES function. *J Virol* 76, 5024-5033.
- Flores, E.F., Kreutz, L.C., and Donis, R.O. (1996). Swine and ruminant pestiviruses require the same cellular factor to enter bovine cells. *J Gen Virol* 77, 1295-1303.
- Frolov, I., McBride, M.S., and Rice, C.M. (1998). Cis-acting RNA elements required for replication of bovine viral diarrhea virus-hepatitis C virus 5' nontranslated region chimeras. *RNA* 4, 1418-1435.
- Gallei, A., Pankraz, A., Thiel, H.J., and Becher, P. (2004). RNA recombination in vivo in the absence of viral replication. *J Virol* 78, 6271-6281.
- Gastaminza, P., Cheng, G., Wieland, S., Zhong, J., Liao, W., and Chisari, F.V. (2008). Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *Journal of virology* 82, 2120-2129.
- Gillespie, L.K., Hoenen, A., Morgan, G., and Mackenzie, J.M. (2010). The endoplasmic reticulum provides the membrane platform for biogenesis of the flavivirus replication complex. *J Virol* 84, 10438-10447.
- Gladue, D.P., Gavrillov, B.K., Holinka, L.G., Fernandez-Sainz, I.J., Vepkhvadze, N.G., Rogers, K., O'Donnell, V., Risatti, G.R., and Borca, M.V. (2011). Identification of an NTPase motif in classical swine fever virus NS4B protein. *Virology* 411, 41-49.
- Gladue, D.P., Holinka, L.G., Largo, E., Fernandez Sainz, I., Carrillo, C., O'Donnell, V., Baker-Branstetter, R., Lu, Z., Ambroggio, X., Risatti, G.R., *et al.* (2012). Classical swine fever virus p7 protein is a viroporin involved in virulence in swine. *J Virol* 86, 6778-6791.
- Gonzalez, M.E., and Carrasco, L. (2003). Viroporins. *FEBS Lett* 552, 28-34.
- Gorbalenya, A.E., Donchenko, A.P., Blinov, V.M., and Koonin, E.V. (1989a). Cysteine proteases of positive strand RNA viruses and chymotrypsin-like serine proteases. A distinct protein superfamily with a common structural fold. *FEBS Lett* 243, 103-114.
- Gorbalenya, A.E., Donchenko, A.P., Koonin, E.V., and Blinov, V.M. (1989b). N-terminal domains of putative helicases of flavi- and pestiviruses may be serine proteases. *Nucleic Acids Res* 17, 3889-3897.
- Gosert, R., Egger, D., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Blum, H.E., Bienz, K., and Moradpour, D. (2003). Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol* 77, 5487-5492.
- Gottipati, K., Ruggli, N., Gerber, M., Tratschin, J.D., Benning, M., Bellamy, H., and Choi, K.H. (2013). The structure of classical swine fever virus N(pro): a novel cysteine Autoprotease and zinc-binding protein involved in subversion of type I interferon induction. *PLoS Pathog* 9, e1003704.
- Gouklani, H., Beyer, C., Drummer, H., Gowans, E.J., Netter, H.J., and Haqshenas, G. (2013). Identification of specific regions in hepatitis C virus core, NS2 and NS5A that genetically interact with p7 and co-ordinate infectious virus production. *J Viral Hepat* 20, e66-71.
- Gouklani, H., Bull, R.A., Beyer, C., Coulibaly, F., Gowans, E.J., Drummer, H.E., Netter, H.J., White, P.A., and Haqshenas, G. (2012). Hepatitis C virus nonstructural protein 5B is involved in virus morphogenesis. *Journal of virology* 86, 5080-5088.
- Grakoui, A., Wychowsky, C., Lin, C., Feinstone, S., and Rice, C. (1993). Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J Virol* 67, 1385-1395.

- Grassmann, C.W., Isken, O., and Behrens, S.E. (1999). Assignment of the Multifunctional NS3 Protein of Bovine Viral Diarrhea Virus during RNA Replication: an In Vivo and In Vitro Study. *J Virol* 73, 9196-9205.
- Grassmann, C.W., Isken, O., Tautz, N., and Behrens, S.E. (2001). Genetic analysis of the pestivirus nonstructural coding region: defects in the NS5A unit can be complemented in trans. *J Virol* 75, 7791-7802.
- Grassmann, C.W., Yu, H., Isken, O., and Behrens, S.E. (2005). Hepatitis C virus and the related bovine viral diarrhea virus considerably differ in the functional organization of the 5' non-translated region: implications for the viral life cycle. *Virology* 333, 349-366.
- Gray, E.W., and Nettleton, P.F. (1987). The ultrastructure of cell cultures infected with border disease and bovine virus diarrhoea viruses. *The Journal of general virology* 68 (Pt 9), 2339-2346.
- Griffin, S.D., Harvey, R., Clarke, D.S., Barclay, W.S., Harris, M., and Rowlands, D.J. (2004). A conserved basic loop in hepatitis C virus p7 protein is required for amantadine-sensitive ion channel activity in mammalian cells but is dispensable for localization to mitochondria. *J Gen Virol* 85, 451-461.
- Grummer, B., Beer, M., Liebler-Tenorio, E., and Greiser-Wilke, I. (2001). Localization of viral proteins in cells infected with bovine viral diarrhoea virus. *J Gen Virol* 82, 2597-2605.
- Grummer, B., Bendfeldt, S., and Greiser-Wilke, I. (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., Bendfeldt, S., Wagner, B., and Greiser-Wilke, I. (2002b). Induction of the intrinsic apoptotic pathway in cells infected with cytopathic bovine virus diarrhoea virus. *Virus Res* 90, 143-153.
- Grummer, B., Grotha, S., and Greiser-Wilke, I. (2004). Bovine viral diarrhoea virus is internalized by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 51, 427-432.
- Guo, H.-C., Sun, S.-Q., Jin, Y., Yang, S.-L., Wei, Y.-Q., Sun, D.-H., Yin, S.-H., Ma, J.-W., Liu, Z.-X., Guo, J.-H., *et al.* (2013). Foot-and-mouth disease virus-like particles produced by a SUMO fusion protein system in *Escherichia coli* induce potent protective immune responses in guinea pigs, swine and cattle. *Veterinary research* 44, 48.
- Han, Q., Manna, D., Belton, K., Cole, R., and Konan, K.V. (2013). Modulation of hepatitis C virus genome encapsidation by nonstructural protein 4B. *J Virol* 87, 7409-7422.
- Harada, T., Tautz, N., and Thiel, H.-J. (2000). E2-p7 region of the bovine viral diarrhea virus polyprotein: processing and functional studies. *J Virol* 74, 9498-9506.
- Hause, B.M., Collin, E.A., Peddireddi, L., Yuan, F., Chen, Z., Hesse, R.A., Gauger, P.C., Clement, T., Fang, Y., and Anderson, G. (2015). Discovery of a novel putative atypical porcine pestivirus in pigs in the USA. *J Gen Virol* 96, 2994-2998.
- Heimann, M., Roman-Sosa, G., Martoglio, B., Thiel, H.J., and Rumenapf, T. (2006). Core protein of pestiviruses is processed at the C terminus by signal peptide peptidase. *J Virol* 80, 1915-1921.
- Heinz, F.X., Collett, M.S., Purcell, R.H., Gould, E.A., Houghton, M., Meyers, G., Rice, C.M., and Thiel, H.-J. (2005). Family Flaviviridae. In *Virus Taxonomy Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, L.A. Ball, U. Desselberger, C.M. Fauquet, J. Maniloff, and M.A. Mayo, eds. (San Diego, USA: Elsevier Academic Press), pp. 981-998.
- Heinz, F.X., Stiasny, K., Puschner-Auer, G., Holzmann, H., Allison, S.L., Mandl, C.W., and Kunz, C. (1994). Structural changes and functional control of the tick-borne encephalitis virus glycoprotein E by the heterodimeric association with protein prM. *Virology* 198, 109-117.
- Hershko, A., and Ciechanover, A. (1992). The ubiquitin system for protein degradation. Annual review of biochemistry 61, 761-807.

- Hijikata, M., Mizushima, H., Tanji, Y., Komoda, Y., Hirowatari, Y., Akagi, T., Kato, N., Kimura, K., and Shimotohno, K. (1993). Proteolytic processing and membrane association of putative nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 10773-10777.
- Hoff, H.S., and Donis, R.O. (1997). Induction of apoptosis and cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by cytopathic bovine viral diarrhea virus infection. *Virus Res* *49*, 101-113.
- Horzinek, M.C., Maess, J., and Laufs, R. (1971). Studies on the substructure of Togaviruses. II. Analysis of equine arteritis, rubella, bovine viral diarrhea, and hog cholera viruses. *Arch f d ges Virusforschung* *33*, 306-318.
- Hulst, M.M., Himes, G., Newbigin, E., and Moormann, R.J. (1994). Glycoprotein E2 of classical swine fever virus: expression in insect cells and identification as a ribonuclease. *Virology* *200*, 558-565.
- Hulst, M.M., and Moormann, R.J. (2001). Erns protein of pestiviruses. *Methods enzymol* *342*, 431-440.
- Hulst, M.M., van Gennip, H.G., and Moormann, R.J. (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). *J Virol* *74*, 9553-9561.
- Iqbal, M., Poole, E., Goodbourn, S., and McCauley, J.W. (2004). Role for bovine viral diarrhea virus Erns glycoprotein in the control of activation of beta interferon by double-stranded RNA. *J Virol* *78*, 136-145.
- Isken, O., Grassmann, C.W., Sarisky, R.T., Kann, M., Zhang, S., Grosse, F., Kao, P.N., and Behrens, S.E. (2003). Members of the NF90/NFAR protein group are involved in the life cycle of a positive-strand RNA virus. *EMBO J* *22*, 5655-5665.
- Isken, O., Grassmann, C.W., Yu, H., and Behrens, S.E. (2004). Complex signals in the genomic 3' nontranslated region of bovine viral diarrhea virus coordinate translation and replication of the viral RNA. *RNA* *10*, 1637-1652.
- Isken, O., Langerwisch, U., Jirasko, V., Rehders, D., Redecke, L., Ramanathan, H., Lindenbach, B.D., Bartenschlager, R., and Tautz, N. (2015). A conserved NS3 surface patch orchestrates NS2 protease stimulation, NS5A hyperphosphorylation and HCV genome replication. *PLoS Pathog* *11*, e1004736.
- Isken, O., Langerwisch, U., Schonherr, R., Lamp, B., Schroder, K., Duden, R., Rumenapf, T.H., and Tautz, N. (2014). Functional characterization of bovine viral diarrhea virus nonstructural protein 5A by reverse genetic analysis and live cell imaging. *J Virol* *88*, 82-98.
- Ivanyi-Nagy, R., Lavergne, J.P., Gabus, C., Ficheux, D., and Darlix, J.L. (2008). RNA chaperoning and intrinsic disorder in the core proteins of Flaviviridae. *Nucleic Acids Res* *36*, 712-725.
- Jirasko, V., Montserret, R., Appel, N., Janvier, A., Eustachi, L., Brohm, C., Steinmann, E., Pietschmann, T., Penin, F., and Bartenschlager, R. (2008). Structural and functional characterization of nonstructural protein 2 for its role in hepatitis C virus assembly. *J Biol Chem* *283*, 28546-28562.
- Jirasko, V., Montserret, R., Lee, J.Y., Gouttenoire, J., Moradpour, D., Penin, F., and Bartenschlager, R. (2010). Structural and functional studies of nonstructural protein 2 of the hepatitis C virus reveal its key role as organizer of virion assembly. *PLoS Pathog* *6*, e1001233.
- Jones, C.T., Murray, C.L., Eastman, D.K., Tassello, J., and Rice, C.M. (2007). Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. *J Virol* *81*, 8374-8383.
- Jones, D.M., Atoom, A.M., Zhang, X., Kottlil, S., and Russell, R.S. (2011). A genetic interaction between the core and NS3 proteins of hepatitis C virus is essential for production of infectious virus. *J Virol* *85*, 12351-12361.
- Kaneko, T., Tanji, Y., Satoh, S., Hijikata, M., Asabe, S., Kimura, K., and Shimotohno, K. (1994). Production of two phosphoproteins from the NS5A region of the hepatitis C viral genome. *Biochem Biophys Res Commun* *205*, 320-326.

- Kao, C.C., Del Vecchio, A.M., and Zhong, W. (1999). De novo initiation of RNA synthesis by a recombinant flaviviridae RNA-dependent RNA polymerase. *Virology* 253, 1-7.
- Kapoor, A., Simmonds, P., Gerold, G., Qaisar, N., Jain, K., Henriquez, J.A., Firth, C., Hirschberg, D.L., Rice, C.M., Shields, S., *et al.* (2011). Characterization of a canine homolog of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 11608-11613.
- Kapoor, A., Simmonds, P., Scheel, T.K., Hjelle, B., Cullen, J.M., Burbelo, P.D., Chauhan, L.V., Duraisamy, R., Sanchez Leon, M., Jain, K., *et al.* (2013). Identification of rodent homologs of hepatitis C virus and pegiviruses. *mBio* 4, e00216-00213.
- Kärber, G. (1931). Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 162, 480-483.
- Khromykh, A.A., Varnavski, A.N., Sedlak, P.L., and Westaway, E.G. (2001). Coupling between Replication and Packaging of Flavivirus RNA: Evidence Derived from the Use of DNA-Based Full-Length cDNA Clones of Kunjin Virus. *J Virol* 75, 4633-4640.
- Kim, J.L., Morgenstern, K.A., Lin, C., Fox, T., Dwyer, M.D., Landro, J.A., Chambers, S.P., Markland, W., Lepre, C.A., O'Malley, E.T., *et al.* (1996). Crystal structure of the hepatitis c virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide. *Cell* 87, 343-355.
- Kim, S.Y., Zhao, J., Liu, X., Fraser, K., Lin, L., Zhang, X., Zhang, F., Dordick, J.S., and Linhardt, R.J. (2017). Interaction of Zika Virus Envelope Protein with Glycosaminoglycans. *Biochemistry* 56, 1151-1162.
- Kirkland, P.D., Frost, M.J., Finlaison, D.S., King, K.R., Ridpath, J.F., and Gu, X. (2007). Identification of a novel virus in pigs--Bungowannah virus: a possible new species of pestivirus. *Virus Res* 129, 26-34.
- Klemens, O., Dubrau, D., and Tautz, N. (2015). Characterization of the Determinants of NS2-3-Independent Virion Morphogenesis of Pestiviruses. *J Virol* 89, 11668-11680.
- Kohlway, A., Pirakitikulr, N., Barrera, F.N., Potapova, O., Engelman, D.M., Pyle, A.M., and Lindenbach, B.D. (2014). Hepatitis C virus RNA replication and virus particle assembly require specific dimerization of the NS4A protein transmembrane domain. *J Virol* 88, 628-642.
- Koopmann, R., Cupelli, K., Redecke, L., Nass, K., Deponte, D.P., White, T.A., Stellato, F., Rehders, D., Liang, M., Andreasson, J., *et al.* (2012). In vivo protein crystallization opens new routes in structural biology. *Nat Methods* 9, 259-262.
- Krey, T., Bontems, F., Vonnhein, C., Vaney, M.-C., Bricogne, G., Rumenapf, T., and Rey, F.A. (2012). Crystal structure of the pestivirus envelope glycoprotein E(rns) and mechanistic analysis of its ribonuclease activity. *Structure (London, England : 1993)* 20, 862-873.
- Krey, T., Himmelreich, A., Heimann, M., Menge, C., Thiel, H.J., Maurer, K., and Rumenapf, T. (2006). Function of bovine CD46 as a cellular receptor for bovine viral diarrhea virus is determined by complement control protein 1. *J Virol* 80, 3912-3922.
- Krey, T., Thiel, H.J., and Rumenapf, T. (2005). Acid-resistant bovine pestivirus requires activation for pH-triggered fusion during entry. *J Virol* 79, 4191-4200.
- Kuhn, R.J., Dowd, K.A., Beth Post, C., and Pierson, T.C. (2015). Shake, rattle, and roll: Impact of the dynamics of flavivirus particles on their interactions with the host. *Virology* 479-480, 508-517.
- La Rocca, S.A., Herbert, R.J., Crooke, H., Drew, T.W., Wileman, T.E., and Powell, P.P. (2005). Loss of interferon regulatory factor 3 in cells infected with classical swine fever virus involves the N-terminal protease, Npro. *J Virol* 79, 7239-7247.
- Lackner, T., Müller, A., König, M., Thiel, H.-J., and Tautz, N. (2005). Persistence of bovine viral diarrhea virus is determined by a cellular cofactor of a viral autoprotease. *J Virol* 79, 9746-9755.

- Lackner, T., Müller, A., Pankraz, A., Becher, P., Thiel, H.-J., Gorbalenya, A.E., and Tautz, N. (2004). Temporal modulation of an autoprotease is crucial for replication and pathogenicity of an RNA virus. *J Virol* **78**, 10765-10775.
- Lackner, T., Thiel, H.-J., and Tautz, N. (2006). Dissection of a viral autoprotease elucidates a function of a cellular chaperone in proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 1510-1515.
- Lai, V.C., Kao, C.C., Ferrari, E., Park, J., Uss, A.S., Wright-Minogue, J., Hong, Z., and Lau, J.Y. (1999). Mutational analysis of bovine viral diarrhea virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* **73**, 10129-10136.
- Lambot, M., Hanon, E., Lecomte, C., Hamers, C., Letesson, J.J., and Pastoret, P.P. (1998). Bovine viral diarrhoea virus induces apoptosis in blood mononuclear cells by a mechanism largely dependent on monocytes. *J Gen Virol* **79**, 1745-1749.
- Lamp, B., Riedel, C., Roman-Sosa, G., Heimann, M., Jacobi, S., Becher, P., Thiel, H.-J., and Rumenapf, T. (2011). Biosynthesis of Classical swine fever virus nonstructural proteins. *J Virol* **85**, 3607-3620.
- Lamp, B., Riedel, C., Wentz, E., Tortorici, M.A., and Rumenapf, T. (2013). Autocatalytic cleavage within classical swine fever virus NS3 leads to a functional separation of protease and helicase. *J Virol* **87**, 11872-11883.
- LaPlante, S.R., Gillard, J.R., Jakalian, A., Aubry, N., Coulombe, R., Brochu, C., Tsantrizos, Y.S., Poirier, M., Kukulj, G., and Beaulieu, P.L. (2010). Importance of ligand bioactive conformation in the discovery of potent indole-diamide inhibitors of the hepatitis C virus NS5B. *J Am Chem Soc* **132**, 15204-15212.
- Largo, E., Gladue, D.P., Huarte, N., Borca, M.V., and Nieva, J.L. (2014). Pore-forming activity of pestivirus p7 in a minimal model system supports genus-specific viroporin function. *Antiviral Res* **101**, 30-36.
- Lattwein, E., Klemens, O., Schwindt, S., Becher, P., and Tautz, N. (2012). Pestivirus virion morphogenesis in the absence of uncleaved nonstructural protein 2-3. *J Virol* **86**, 427-437.
- Lecot, S., Belouzard, S., Dubuisson, J., and Rouille, Y. (2005). Bovine viral diarrhea virus entry is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* **79**, 10826-10829.
- Lewis, J.K., Bothner, B., Smith, T.J., and Siuzdak, G. (1998). Antiviral agent blocks breathing of the common cold virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6774-6778.
- Li, Y., Wang, J., Kanai, R., and Modis, Y. (2013). Crystal structure of glycoprotein E2 from bovine viral diarrhea virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 6805-6810.
- Lin, C., Lindenbach, B.D., Prágai, B.M., McCourt, D.W., and Rice, C.M. (1994). Processing in the Hepatitis C Virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *J Virol* **68**, 5063-5073.
- Lindenbach, B.D. (2013). Virion assembly and release. *Curr Top Microbiol Immunol* **369**, 199-218.
- Lindenbach, B.D., Murray, C.L., Thiel, H.J., and Rice, C.M. (2013). *Flaviviridae*. In Fields Virology D.M. Knipe, and P.M. Howley, eds. (Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins), pp. 712-746.
- Lindenbach, B.D., Prágai, B.M., Montserret, R., Beran, R.K., Pyle, A.M., Penin, F., and Rice, C.M. (2007). The C terminus of hepatitis C virus NS4A encodes an electrostatic switch that regulates NS5A hyperphosphorylation and viral replication. *J Virol* **81**, 8905-8918.
- Linnen, J., Wages, J., Zhang-Keck, Z.-Y., Fry, K.E., Krawczynsky, K.Z., Alter, H., Koonin, E., Gallagher, M., Alter, M., Hadziyannis, S., *et al.* (1996). Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science* **271**, 505-508.

- Liu, L., Kampa, J., Belak, S., and Baule, C. (2009). Virus recovery and full-length sequence analysis of atypical bovine pestivirus Th/04_KhonKaen. *Veterinary microbiology* 138, 62-68.
- Lohmann, V., Korner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L., and Bartenschlager, R. (1999). Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 285, 110-113.
- Luo, D., Xu, T., Hunke, C., Gruber, G., Vasudevan, S.G., and Lescar, J. (2008). Crystal structure of the NS3 protease-helicase from dengue virus. *J Virol* 82, 173-183.
- Luscombe, C.A., Huang, Z., Murray, M.G., Miller, M., Wilkinson, J., and Ewart, G.D. (2010). A novel Hepatitis C virus p7 ion channel inhibitor, BIT225, inhibits bovine viral diarrhea virus in vitro and shows synergism with recombinant interferon-alpha-2b and nucleoside analogues. *Antiviral Res* 86, 144-153.
- Ma, Y., Anantpadma, M., Timpe, J.M., Shanmugam, S., Singh, S.M., Lemon, S.M., and Yi, M. (2011). Hepatitis C virus NS2 protein serves as a scaffold for virus assembly by interacting with both structural and nonstructural proteins. *J Virol* 85, 86-97.
- MacArthur, M.W., and Thornton, J.M. (1991). Influence of proline residues on protein conformation. *J Mol Biol* 218, 397-412.
- Macovei, A., Zitzmann, N., Lazar, C., Dwek, R.A., and Branza-Nichita, N. (2006). Brefeldin A inhibits pestivirus release from infected cells, without affecting its assembly and infectivity. *Biochem Biophys Res Commun* 346, 1083-1090.
- Madan, V., and Bartenschlager, R. (2015). Structural and Functional Properties of the Hepatitis C Virus p7 Viroprotein. *Viruses* 7, 4461-4481.
- Magkouras, I., Matzener, P., Rümenapf, T., Peterhans, E., and Schweizer, M. (2008). RNase-dependent inhibition of extracellular, but not intracellular, dsRNA-induced interferon synthesis by Erns of pestiviruses. *J Gen Virol* 89, 2501-2506.
- Mandl, C.W., Kroschewski, H., Allison, S.L., Kofler, R., Holzmann, H., Meixner, T., and Heinz, F.X. (2001). Adaptation of tick-borne encephalitis virus to BHK-21 cells results in the formation of multiple heparan sulfate binding sites in the envelope protein and attenuation in vivo. *J Virol* 75, 5627-5637.
- Masaki, T., Suzuki, R., Murakami, K., Aizaki, H., Ishii, K., Murayama, A., Date, T., Matsuura, Y., Miyamura, T., Wakita, T., *et al.* (2008). Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. *J Virol* 82, 7964-7976.
- Matzener, P., Magkouras, I., Rümenapf, T., Peterhans, E., and Schweizer, M. (2009). The viral RNase E(rns) prevents IFN type-I triggering by pestiviral single- and double-stranded RNAs. *Virus Res* 140, 15-23.
- Maurer, K., Krey, T., Moennig, V., Thiel, H.J., and Rumenapf, T. (2004). CD46 is a cellular receptor for bovine viral diarrhea virus. *J Virol* 78, 1792-1799.
- Mayer, A.N., and Wilkinson, K.D. (1989). Detection, resolution, and nomenclature of multiple ubiquitin carboxyl-terminal esterases from bovine calf thymus. *Biochemistry* 28, 166-172.
- Mendez, E., Ruggli, N., Collett, M.S., and Rice, C.M. (1998). Infectious bovine viral diarrhea virus (strain NADL) RNA from stable cDNA clones: a cellular insert determines NS3 production and viral cytopathogenicity. *Journal of virology* 72, 4737-4745.
- Meyer, C., Von Freyburg, M., Elbers, K., and Meyers, G. (2002). Recovery of virulent and RNase-negative attenuated type 2 bovine viral diarrhea viruses from infectious cDNA clones. *J Virol* 76, 8494-8503.
- Meyers, G., Rümenapf, T., Tautz, N., Dubovi, E., and Thiel, H.-J. (1991). Insertion of cellular sequences in the genome of bovine viral diarrhea virus. *Arch Virol Suppl.* 3, 133-142.
- Meyers, G., Rümenapf, T., and Thiel, H.-J. (1989a). Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus. *Virology* 171, 555-567.

- Meyers, G., Rümenapf, T., and Thiel, H.-J. (1989b). Ubiquitin in a togavirus. *Nature* **341**, 491.
- Meyers, G., Saalmüller, A., and Büttner, M. (1999). Mutations abrogating the RNase activity in glycoprotein e(rns) of the pestivirus classical swine fever virus lead to virus attenuation. *J Virol* **73**, 10224-10235.
- Meyers, G., Tautz, N., Becher, P., Thiel, H.-J., and Kümmerer, B. (1996). Recovery of cytopathogenic and noncytopathogenic bovine viral diarrhoea viruses from cDNA constructs. *J Virol* **70**, 8606-8613.
- Meyers, G., Tautz, N., Stark, R., Brownlie, J., Dubovi, E.J., Collett, M.S., and Thiel, H.-J. (1992). Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic pestiviruses. *Virology* **191**, 368-386.
- Meyers, G., and Thiel, H.-J. (1996). Molecular characterization of pestiviruses. *Advances in virus research* **47**, 53-117.
- Moennig, V., and Plagemann, P.G.W. (1992). The pestiviruses. *Adv Vir Res* **41**, 53-98.
- Moormann, R.J., Warmerdam, P.A., van der Meer, B., and Hulst, M.M. (1990). Nucleotide sequence of hog cholera virus RNA: properties of the polyprotein encoded by the open reading frame spanning the viral genomic RNA. *Vet Microbiol* **23**, 185-191.
- Moradpour, D., Evans, M.J., Gosert, R., Yuan, Z., Blum, H.E., Goff, S.P., Lindenbach, B.D., and Rice, C.M. (2004). Insertion of green fluorescent protein into nonstructural protein 5A allows direct visualization of functional hepatitis C virus replication complexes. *J Virol* **78**, 7400-7409.
- Moradpour, D., Gosert, R., Egger, D., Penin, F., Blum, H.E., and K., B. (2003). Membrane association of hepatitis C virus nonstructural proteins and identification of the membrane alteration that harbors the viral replication complex. *Antiviral Res* **60**, 103-109.
- Mottola, G., Cardinali, G., Ceccacci, A., Trozzi, C., Bartholomew, L., Torrisi, M.R., Pedrazzini, E., Bonatti, S., and Migliaccio, G. (2002). Hepatitis C virus nonstructural proteins are localized in a modified endoplasmic reticulum of cells expressing viral subgenomic replicons. *Virology* **293**, 31-43.
- Moulin, H.R., Seuberlich, T., Bauhofer, O., Bennett, L.C., Tratschin, J.D., Hofmann, M.A., and Ruggli, N. (2007). Nonstructural proteins NS2-3 and NS4A of classical swine fever virus: essential features for infectious particle formation. *Virology* **365**, 376-389.
- Muerhoff, A.S., Leary, T.P., Simons, J.N., Pilot-Matias, T.J., Dawson, G.J., Erker, J.C., Chalmers, M.L., Schlauder, G.G., Desai, S.M., and Mushahwar, I.K. (1995). Genomic organization of GB viruses A and B: two new members of the Flaviviridae associated with GB agent hepatitis. *J Virol* **69**, 5621-5630.
- Murray, C.L., Jones, C.T., and Rice, C.M. (2008a). Architects of assembly: roles of Flaviviridae non-structural proteins in virion morphogenesis. *Nat Rev Microbiol* **6**, 699-708.
- Murray, C.L., Marcotrigiano, J., and Rice, C.M. (2008b). Bovine viral diarrhoea virus core is an intrinsically disordered protein that binds RNA. *J Virol* **82**, 1294-1304.
- Myers, T.M., Kolupaeva, V.G., Mendez, E., Baginski, S.G., Frolov, I., Hellen, C.U., and Rice, C.M. (2001). Efficient translation initiation is required for replication of bovine viral diarrhoea virus subgenomic replicons. *J Virol* **75**, 4226-4238.
- Nomura-Takigawa, Y., Nagano-Fujii, M., Deng, L., Kitazawa, S., Ishido, S., Sada, K., and Hotta, H. (2006). Non-structural protein 4A of Hepatitis C virus accumulates on mitochondria and renders the cells prone to undergoing mitochondria-mediated apoptosis. *J Gen Virol* **87**, 1935-1945.
- Ohmann, H.B. (1990). Electron microscopy of bovine virus diarrhoea virus. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* **9**, 61-73.
- Pankraz, A., Thiel, H.J., and Becher, P. (2005). Essential and nonessential elements in the 3' nontranslated region of Bovine viral diarrhoea virus. *J Virol* **79**, 9119-9127.

- Paredes, A.M., and Blight, K.J. (2008). A genetic interaction between hepatitis C virus NS4B and NS3 is important for RNA replication. *J Virol* 82, 10671-10683.
- Parsy, C.C., Alexandre, F.R., Bidau, V., Bonnaterre, F., Brandt, G., Caillet, C., Cappelle, S., Chaves, D., Convard, T., Derock, M., *et al.* (2015). Discovery and structural diversity of the hepatitis C virus NS3/4A serine protease inhibitor series leading to clinical candidate IDX320. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 25, 5427-5436.
- Patel, M., Yanagishita, M., Roderiquez, G., Bou-Habib, D.C., Oravec, T., Hascall, V.C., and Norcross, M.A. (1993). Cell-surface heparan sulfate proteoglycan mediates HIV-1 infection of T-cell lines. *AIDS research and human retroviruses* 9, 167-174.
- Paton, D.J., Carlsson, U., Lowings, J.P., Sands, J.J., Vilcek, S., and Alenius, S. (1995). Identification of herd-specific bovine viral diarrhoea virus isolates from infected cattle and sheep. *Veterinary microbiology* 43, 283-294.
- Paul, D., Romero-Brey, I., Gouttenoire, J., Stoitsova, S., Krijnse-Locker, J., Moradpour, D., and Bartenschlager, R. (2011). NS4B self-interaction through conserved C-terminal elements is required for the establishment of functional hepatitis C virus replication complexes. *J Virol* 85, 6963-6976.
- Phan, T., Beran, R.K.F., Peters, C., Lorenz, I., and Lindenbach, B.D. (2009). Hepatitis C virus NS2 protein contributes to virus particle assembly via opposing epistatic interactions with the E1-E2 glycoprotein and NS3-4A enzyme complexes. *J Virol*, JVI.00891-00809.
- Phan, T., Kohlway, A., Dimberu, P., Pyle, A.M., and Lindenbach, B.D. (2011). The acidic domain of hepatitis C virus NS4A contributes to RNA replication and virus particle assembly. *J Virol* 85, 1193-1204.
- Phoo, W.W., Li, Y., Zhang, Z., Lee, M.Y., Loh, Y.R., Tan, Y.B., Ng, E.Y., Lescar, J., Kang, C., and Luo, D. (2016). Structure of the NS2B-NS3 protease from Zika virus after self-cleavage. *Nature communications* 7, 13410.
- Pietschmann, T., Kaul, A., Koutsoudakis, G., Shavinskaya, A., Kallis, S., Steinmann, E., Abid, K., Negro, F., Dreux, M., Cosset, F.-L., *et al.* (2006). Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 7408-7413.
- Pietschmann, T., Zayas, M., Meuleman, P., Long, G., Appel, N., Koutsoudakis, G., Kallis, S., Leroux-Roels, G., Lohmann, V., and Bartenschlager, R. (2009). Production of infectious genotype 1b virus particles in cell culture and impairment by replication enhancing mutations. *PLoS Pathog* 5, e1000475.
- Poole, T.L., Wang, C., Popp, R.A., Potgieter, L.N.D., Siddiqui, A., and Collett, M.S. (1995). Pestivirus translation occurs by internal ribosome entry. *Virology* 206, 750-754.
- Quan, P.L., Firth, C., Conte, J.M., Williams, S.H., Zambrana-Torrel, C.M., Anthony, S.J., Ellison, J.A., Gilbert, A.T., Kuzmin, I.V., Niezgod, M., *et al.* (2013). Bats are a major natural reservoir for hepaciviruses and pegiviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 8194-8199.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., and Bateman, A. (2012). MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res* 40, D343-350.
- Rebhun, W.C., French, T.W., Perdrizet, J.A., Dubovi, E.J., Dill, S.G., and Karcher, L.F. (1989). Thrombocytopenia associated with acute bovine virus diarrhoea infection in cattle. *J Vet Intern Med* 3, 42-46.
- Redmann, K.L., and Rechsteiner, M. (1989). Identification of the long ubiquitin extension as ribosomal protein S27a. *Nature* 338, 438-440.
- Reed, K.E., Gorbalenya, A.E., and Rice, C.M. (1998). The NS5A/NS5 proteins of viruses from three genera of the family flaviviridae are phosphorylated by associated serine/threonine kinases. *J Virol* 72, 6199-6206.

- Rey, F.A., Heinz, F.X., Mandl, C., Kunz, C., and Harrison, S.C. (1995). The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* 375, 291-298.
- Riedel, C., Lamp, B., Hagen, B., Indik, S., and Rumenapf, T. (2017). The core protein of a pestivirus protects the incoming virus against IFN-induced effectors. *Scientific reports* 7, 44459.
- Riedel, C., Lamp, B., Heimann, M., König, M., Blome, S., Moennig, V., Schuttler, C., Thiel, H.J., and Rumenapf, T. (2012). The core protein of classical Swine Fever virus is dispensable for virus propagation in vitro. *PLoS Pathog* 8, e1002598.
- Riedel, C., Lamp, B., Heimann, M., and Rumenapf, T. (2010). Characterization of essential domains and plasticity of the Classical Swine Fever Virus Core protein. *J Virol*.
- Rijnbrand, R., v.d. Straaten, T., v. Rijn, P.A., Spaan, W.J.M., and Breidenbeek, P.J. (1997). Internal entry of ribosomes is directed by the 5' noncoding region of classical swine fever virus and is dependent on the presence of an RNA pseudoknot upstream of the initiation codon. *J Virol* 71, 451-457.
- Rinck, G., Birghan, C., Harada, T., Meyers, G., Thiel, H.-J., and Tautz, N. (2001). A cellular J-domain protein modulates polyprotein processing and cytopathogenicity of a pestivirus. *J Virol* 75, 9470-9482.
- Romero-Brey, I., and Bartenschlager, R. (2014). Membranous replication factories induced by plus-strand RNA viruses. *Viruses* 6, 2826-2857.
- Ronecker, S., Zimmer, G., Herrler, G., Greiser-Wilke, I., and Grummer, B. (2008). Formation of bovine viral diarrhoea virus E1-E2 heterodimers is essential for virus entry and depends on charged residues in the transmembrane domains. *J Gen Virol* 89, 2114-2121.
- Ross-Thriepland, D., and Harris, M. (2015). Hepatitis C virus NS5A: enigmatic but still promiscuous 10 years on! *J Gen Virol* 96, 727-738.
- Ruggli, N., Tratschin, J.D., Schweizer, M., McCullough, K.C., Hofmann, M.A., and Summerfield, A. (2003). Classical swine fever virus interferes with cellular antiviral defense: evidence for a novel function of N(pro). *J Virol* 77, 7645-7654.
- Rumenapf, T., Unger, G., Strauss, J.H., and Thiel, H.J. (1993). Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. *J Virol* 67, 3288-3295.
- Russell, P.K., Brandt, W.E., and Dalrymple, J.M. (1980). Chemical and antigenic structure of flaviviruses. In *The togaviruses*, R.W. Schlesinger, ed. (New York: Academic Press), pp. 503-529.
- Sakai, A., Claire, M.S., Faulk, K., Govindarajan, S., Emerson, S.U., Purcell, R.H., and Bukh, J. (2003). The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 11646-11651.
- Schägger, H., and von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166, 368-379.
- Schlotthauer, F. (2017). Role of non-structural protein 4A in pestiviral virion morphogenesis. Institute of Virology and Cell Biology, University of Luebeck.
- Schmeiser, S., Mast, J., Thiel, H.J., and König, M. (2014). Morphogenesis of pestiviruses: new insights from ultrastructural studies of strain Giraffe-1. *J Virol* 88, 2717-2724.
- Schneider, R., Unger, G., Stark, R., Schneider-Scherzer, E., and Thiel, H.-J. (1993). Identification of a structural glycoprotein of an RNA virus as a ribonuclease. *Science* 261, 1169-1171.
- Schregel, V., Jacobi, S., Penin, F., and Tautz, N. (2009). Hepatitis C virus NS2 is a protease stimulated by cofactor domains in NS3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 5342-5347.

- Schultz, D.E., Honda, M., Whetter, L.E., McKnight, K.L., and Lemon, S.M. (1996). Mutations within the 5' nontranslated RNA of cell culture-adapted hepatitis A virus which enhance cap-independent translation in cultured African green monkey kidney cells. *J Virol* **70**, 1041-1049.
- Schweizer, M., and Peterhans, E. (1999). Oxidative stress in cells infected with bovine viral diarrhoea virus: a crucial step in the induction of apoptosis. *J Gen Virol* **80**, 1147-1155.
- Schweizer, M., and Peterhans, E. (2001). Noncytopathic bovine viral diarrhea virus inhibits double-stranded RNA-induced apoptosis and interferon synthesis. *J Virol* **75**, 4692-4698.
- Seago, J., Hilton, L., Reid, E., Doceul, V., Jeyatheesan, J., Moganeradj, K., McCauley, J., Charleston, B., and Goodbourn, S. (2007). The Npro product of classical swine fever virus and bovine viral diarrhoea virus uses a conserved mechanism to target interferon regulatory factor-3. *J Gen Virol* **88**, 3002-3006.
- Shavinskaya, A., Boulant, S., Penin, F., McLauchlan, J., and Bartenschlager, R. (2007). The lipid droplet binding domain of hepatitis C virus core protein is a major determinant for efficient virus assembly. *J Biol Chem* **282**, 37158-37169.
- Sheng, C., Chen, Y., Xiao, J., Wang, J., Li, G., Chen, J., and Xiao, M. (2012). Classical swine fever virus NS5A protein interacts with 3'-untranslated region and regulates viral RNA synthesis. *Virus Res* **163**, 636-643.
- Sibley, S.D., Lauck, M., Bailey, A.L., Hyeroba, D., Tumukunde, A., Weny, G., Chapman, C.A., O'Connor, D.H., Goldberg, T.L., and Friedrich, T.C. (2014). Discovery and characterization of distinct simian pegiviruses in three wild African Old World monkey species. *PLoS One* **9**, e98569.
- Simmonds, P., Becher, P., Bukh, J., Gould, E.A., Meyers, G., Monath, T., Muerhoff, S., Pletnev, A., Rico-Hesse, R., Smith, D.B., *et al.* (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. *J Gen Virol* **98**, 2-3.
- Simons, J.N., Pilot-Matias, T.J., Leary, T.P., Dawson, G.H., Desai, S.M., Schlauder, G.G., Muerhoff, A.S., Erker, J.C., Buijk, S.L., Chalmers, M.L., *et al.* (1995). Identification of two flavivirus-like genomes in the GB hepatitis agent. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 3401-3405.
- Smith, D.B., Becher, P., Bukh, J., Gould, E.A., Meyers, G., Monath, T., Muerhoff, A.S., Pletnev, A., Rico-Hesse, R., Stapleton, J.T., *et al.* (2016). Proposed update to the taxonomy of the genera Hepacivirus and Pegivirus within the Flaviviridae family. *J Gen Virol* **97**, 2894-2907.
- Soumana, D.I., Kurt Yilmaz, N., Ali, A., Prachanronarong, K.L., and Schiffer, C.A. (2016). Molecular and Dynamic Mechanism Underlying Drug Resistance in Genotype 3 Hepatitis C NS3/4A Protease. *J Am Chem Soc* **138**, 11850-11859.
- Stadler, K., Allison, S.L., Schlich, J., and Heinz, F.X. (1997). Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *J Virol* **71**, 8475-8481.
- Stapleford, K.A., and Lindenbach, B.D. (2011). Hepatitis C virus NS2 coordinates virus particle assembly through physical interactions with the E1-E2 glycoprotein and NS3-NS4A enzyme complexes. *Journal of virology* **85**, 1706-1717.
- Stark, R., Meyers, G., Rümenapf, T., and Thiel, H.-J. (1993). Processing of pestivirus polyprotein: Cleavage site between autoprotease and nucleocapsid protein of classical swine fever virus. *J Virol* **67**, 7088-7095.
- Steffens, S., Thiel, H.-J., and Behrens, S.-E. (1999). The RNA-dependent RNA polymerases of different members of the family Flaviviridae exhibit similar properties in vitro. *J Gen Virol* **80**, 2583-2590.
- Steinmann, E., Penin, F., Kallis, S., Patel, A.H., Bartenschlager, R., and Pietschmann, T. (2007). Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. *PLoS Pathog* **3**, e103.
- Sutter, G., Ohlmann, M., and Erfle, V. (1995). Non-replicating vaccinia vector efficiently expresses bacteriophage T7 RNA polymerase. *FEBS Letters* **371**, 9-12.

- Tamura, J.K., Warrener, P., and Collett, M.S. (1993). RNA-stimulated NTPase activity associated with the p80 protein of the pestivirus bovine viral diarrhea virus. *Virology* 193, 1-10.
- Tautz, N., Elbers, K., Stoll, D., Meyers, G., and Thiel, H.-J. (1997). Serine protease of pestiviruses: determination of cleavage sites. *J Virol* 71, 5415-5422.
- Tautz, N., Harada, T., Kaiser, A., Rinck, G., Behrens, S.E., and Thiel, H.-J. (1999). Establishment and characterization of cytopathogenic and noncytopathogenic pestivirus replicons. *J Virol* 73, 9422-9432.
- Tautz, N., Kaiser, A., and Thiel, H.-J. (2000). NS3 serine protease of bovine viral diarrhea virus: characterization of active site residues, NS4A cofactor domain, and protease-cofactor interactions. *Virology* 273, 351-363.
- Tautz, N., Meyers, G., Stark, R., Dubovi, E.J., and Thiel, H.-J. (1996). Cytopathogenicity of a pestivirus correlates with a 27-nucleotide insertion. *J Virol* 70, 7851-7858.
- Tautz, N., Meyers, G., and Thiel, H.J. (1993). Processing of poly-ubiquitin in the polyprotein of an RNA virus. *Virology* 197, 74-85.
- Tautz, N., Tews, B.A., and Meyers, G. (2015). The Molecular Biology of Pestiviruses. *Adv Virus Res* 93, 47-160.
- Tautz, N., and Thiel, H.-J. (2003). Cytopathogenicity of pestiviruses: cleavage of bovine viral diarrhea virus NS2-3 has to occur at a defined position to allow viral replication. *Arch Virol* 148, 1405-1412.
- Tellinghuisen, T.L., Marcotrigiano, J., Gorbalenya, A.E., and Rice, C.M. (2004). The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein. *J Biol Chem* 279, 48576-48587.
- Tellinghuisen, T.L., Paulson, M.S., and Rice, C.M. (2006). The NS5A protein of bovine viral diarrhea virus contains an essential zinc-binding site similar to that of the hepatitis C virus NS5A protein. *J Virol* 80, 7450-7458.
- Tews, B.A., and Meyers, G. (2007). The pestivirus glycoprotein Erns is anchored in plane in the membrane via an amphipathic helix. *J Biol Chem* 282, 32730-32741.
- Thiel, H.-J., Stark, R., Weiland, E., Rumenapf, T., and Meyers, G. (1991). Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. *J Virol* 65, 4705-4712.
- Vassilev, V.B., and Donis, R.O. (2000). Bovine viral diarrhea virus induced apoptosis correlates with increased intracellular viral RNA accumulation. *Virus Res* 69, 95-107.
- Vilcek, S., Durkovic, B., Kolesarova, M., and Paton, D.J. (2005). Genetic diversity of BVDV: consequences for classification and molecular epidemiology. *Prev Vet Med* 72, 31-35; discussion 215-219.
- Vilcek, S., and Nettleton, P.F. (2006). Pestiviruses in wild animals. *Veterinary microbiology* 116, 1-12.
- Vogt, D.A., Camus, G., Herker, E., Webster, B.R., Tsou, C.L., Greene, W.C., Yen, T.S., and Ott, M. (2013). Lipid droplet-binding protein TIP47 regulates hepatitis C Virus RNA replication through interaction with the viral NS5A protein. *PLoS Pathog* 9, e1003302.
- Walter, S., Rasche, A., Moreira-Soto, A., Pfaender, S., Bletsa, M., Corman, V.M., Aguilar-Setien, A., Garcia-Lacy, F., Hans, A., Todt, D., *et al.* (2017). Differential Infection Patterns and Recent Evolutionary Origins of Equine Hepaciviruses in Donkeys. *J Virol* 91.
- Wang, Y., Xiao, M., Chen, J., Zhang, W., Luo, J., Bao, K., Nie, M., Chen, J., and Li, B. (2007). Mutational analysis of the GDD sequence motif of classical swine fever virus RNA-dependent RNA polymerases. *Virus Genes* 34, 63-65.
- Wang, Z., Nie, Y., Wang, P., Ding, M., and Deng, H. (2004). Characterization of classical swine fever virus entry by using pseudotyped viruses: E1 and E2 are sufficient to mediate viral entry. *Virology* 330, 332-341.

- Warrener, P., and Collett, M.S. (1995). Pestivirus NS3 (p80) protein possesses RNA helicase activity. *Journal of virology* *69*, 1720-1726.
- Weiland, E., Stark, R., Haas, B., Rumenapf, T., Meyers, G., and Thiel, H.J. (1990). Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer. *J Virol* *64*, 3563-3569.
- Weiland, F., Weiland, E., Unger, G., Saalmuller, A., and Thiel, H.J. (1999). Localization of pestiviral envelope proteins E(rns) and E2 at the cell surface and on isolated particles. *J Gen Virol* *80 (Pt 5)*, 1157-1165.
- Weiland, S., Ahl, R., Stark, R., Weiland, F., and Thiel, H.-J. (1992). A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a pestivirus, hog cholera virus. *J Virol* *66*, 3677-3682.
- Weiskircher, E., Aligo, J., Ning, G., and Konan, K.V. (2009). Bovine viral diarrhea virus NS4B protein is an integral membrane protein associated with Golgi markers and rearranged host membranes. *Virol J* *6*, 185.
- Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C.K., Walther, P., Fuller, S.D., Antony, C., Krijnse-Locker, J., and Bartenschlager, R. (2009). Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe* *5*, 365-375.
- Westaway, E.G., Brinton, M.A., SYa, G., Horzinek, M.C., Igarashi, A., Kääriäinen, L., Lvov, D.K., Porterfield, J.S., Russell, P.K., and Trent, D.W. (1985). *Togaviridae*. *Intervirology* *24*, 125-139.
- Windisch, J.M., Schneider, R., Stark, R., Weiland, E., Meyers, G., and Thiel, H.-J. (1996). RNase of Classical swine fever virus: Biochemical characterization and inhibition by virus-neutralizing monoclonal antibodies. *J Virol* *70*, 352-358.
- Wiskerchen, M., Belzer, S.K., and Collett, M.S. (1991). Pestivirus gene expression: the first protein product of the bovine viral diarrhea virus large open reading frame, p20, possesses proteolytic activity. *J Virol* *65*, 4508-4514.
- Wiskerchen, M., and Collett, M.S. (1991). Pestivirus gene expression: protein p80 of bovine viral diarrhea virus is a proteinase involved in polyprotein processing. *Virology* *184*, 341-350.
- Wolk, B., Sansonno, D., Krausslich, H.G., Dammacco, F., Rice, C.M., Blum, H.E., and Moradpour, D. (2000). Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. *J Virol* *74*, 2293-2304.
- Wozniak, A.L., Griffin, S., Rowlands, D., Harris, M., Yi, M., Lemon, S.M., and Weinman, S.A. (2010). Intracellular proton conductance of the hepatitis C virus p7 protein and its contribution to infectious virus production. *PLoS Pathog* *6*, e1001087.
- Wu, Z., Ren, X., Yang, L., Hu, Y., Yang, J., He, G., Zhang, J., Dong, J., Sun, L., Du, J., *et al.* (2012). Virome analysis for identification of novel mammalian viruses in bat species from Chinese provinces. *J Virol* *86*, 10999-11012.
- Xiao, M., Wang, Y., Zhu, Z., Yu, J., Wan, L., and Chen, J. (2009). Influence of NS5A protein of classical swine fever virus (CSFV) on CSFV internal ribosome entry site-dependent translation. *J Gen Virol* *90*, 2923-2928.
- Xu, J., Mendez, E., Caron, P.R., Lin, C., Murcko, M.A., Collett, M.S., and Rice, C.M. (1997). Bovine viral diarrhea virus NS3 serine proteinase: polyprotein cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of an enzyme essential for pestivirus replication. *J Virol* *71*, 5312-5322.
- Yao, N., Reichert, P., Taremi, S.S., Prosise, W.W., and Weber, P.C. (1999). Molecular views of viral polyprotein processing revealed by the crystal structure of the hepatitis C virus bifunctional protease-helicase. *Structure* *7*, 1353-1363.

- Yi, M., Ma, Y., Yates, J., and Lemon, S.M. (2007). Compensatory mutations in E1, p7, NS2, and NS3 enhance yields of cell culture-infectious intergenotypic chimeric hepatitis C virus. *J Virol* 81, 629-638.
- Yi, M., Ma, Y., Yates, J., and Lemon, S.M. (2009). Trans-complementation of an NS2 defect in a late step in hepatitis C virus (HCV) particle assembly and maturation. *PLoS Pathog* 5, e1000403.
- Yost, S.A., and Marcotrigiano, J. (2013). Viral precursor polyproteins: keys of regulation from replication to maturation. *Current opinion in virology* 3, 137-142.
- Yu, H., Grassmann, C.W., and Behrens, S.-E. (1999). Sequence and structural elements at the 3' terminus of bovine viral diarrhea virus genomic RNA: functional role during RNA replication. *J Virol* 73, 3638-3648.
- Yu, H., Isken, O., Grassmann, C.W., and Behrens, S.-E. (2000). A stem-loop motif formed by the immediate 5' terminus of the bovine viral diarrhea virus genome modulates translation as well as replication of the viral RNA. *J Virol* 74, 5825-5835.
- Yu, I.M., Zhang, W., Holdaway, H.A., Li, L., Kostyuchenko, V.A., Chipman, P.R., Kuhn, R.J., Rossmann, M.G., and Chen, J. (2008). Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science* 319, 1834-1837.
- Yu, L., Takeda, K., and Markoff, L. (2013). Protein-protein interactions among West Nile non-structural proteins and transmembrane complex formation in mammalian cells. *Virology* 446, 365-377.
- Zayas, M., Long, G., Madan, V., and Bartenschlager, R. (2016). Coordination of Hepatitis C Virus Assembly by Distinct Regulatory Regions in Nonstructural Protein 5A. *PLoS Pathog* 12, e1005376.
- Zhang, G., Aldridge, S., Clarke, M.C., and McCauley, J.W. (1996). Cell death induced by cytopathic bovine diarrhoea virus is mediated by apoptosis. *J Gen Virol* 77, 1677-1681.
- Zhang, Z., Li, Y., Loh, Y.R., Phoo, W.W., Hung, A.W., Kang, C., and Luo, D. (2016). Crystal structure of unlinked NS2B-NS3 protease from Zika virus. *Science* 354, 1597-1600.
- Zhong, W., Gutshall, L.L., and Del Vecchio, A.M. (1998). Identification and characterization of an RNA-dependent RNA polymerase activity within the nonstructural protein 5B region of bovine viral diarrhea virus. *J Virol* 72, 9365-9369.
- Zögg, T., Sponring, M., Schindler, S., Koll, M., Schneider, R., Brandstetter, H., and Auer, B. (2013). Crystal structures of the viral protease Npro imply distinct roles for the catalytic water in catalysis. *Structure* 21, 929-938.
- Zuo, Z., Liew, O.W., Chen, G., Chong, P.C., Lee, S.H., Chen, K., Jiang, H., Pua, C.M., and Zhu, W. (2009). Mechanism of NS2B-mediated activation of NS3pro in dengue virus: molecular dynamics simulations and bioassays. *J Virol* 83, 1060-1070.

7. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. Norbert Tautz für die Möglichkeit am Institut für Virologie und Zellbiologie zu promovieren sowie für die Ausgabe des Themas und die Betreuung meiner Doktorarbeit. Ich danke ihm für die inspirierenden Diskussionen, seine Begeisterungsfähigkeit für die Wissenschaft, die vielen Ratschläge und Ideen sowie für seine stete Motivation und Unterstützung.

Dr. Olaf Isken für seine Unterstützung und Hilfsbereitschaft im Labor als auch beim Verfassen von wissenschaftlichen Veröffentlichungen. Ich danke ihm für die konstruktiven Diskussionen, die zahlreichen Ideen und Lösungsansätze sowie für das Korrekturlesen meiner Doktorarbeit.

Martina Alexander, Stefanie Schwindt und Barbara Bruhn für ihre tatkräftige Unterstützung bei Experimenten und allen Mitarbeitern des Instituts für Virologie und Zellbiologie für ihre Hilfsbereitschaft, die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima.

Dr. Oliver Klemens für die gute Einarbeitung und Zusammenarbeit sowie für die umfassenden Vorarbeiten zu „unserem“ Thema.

Meinen Mitdoktoranden und ehemaligen Mitstreitern Henrik Wegener, Dr. Ulrike Langerwisch, Dr. Oliver Klemens, Iris Schmuck-Barkmann, Steffi Jung, Corinna Erfurth und Marit Lingemann für ihre ständige Unterstützung, die motivierenden Gespräche sowie den Austausch im Labor und bei den Seminaren als auch für die vielen lustigen Momente und schönen Erinnerungen.

Prof. Dr. Enno Hartmann und Susanne Allan vom Institut für Biologie für die Bereitstellung des Odyssey Imaging Systems und des Phosphorimagers sowie für die Einarbeitung in beide Systeme.

Prof. Dr. Félix A. Rey und PD Dr. Maria-Alejandra Tortorici vom Institut Pasteur in Paris für die gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung der CSFV NS3/4A-Kristallstruktur.

Meinen Eltern, für die Ermöglichung meines Studiums und ihre fortwährende Unterstützung sowie für den Rückhalt in jeglichen Lebenslagen. Insbesondere danke ich meiner Mutter für ihre Unterstützung in der Schreibphase meiner Arbeit.

Meinen Töchtern, die jeden Tag für die notwendige Ablenkung und Freude sorgten und mir Motivation und Kraft gaben meine Doktorarbeit fertigzustellen.

Meiner Ehefrau Christin, die mich in den letzten Jahren bedingungslos unterstützt und auch in den schwierigsten Zeiten zu mir gehalten hat. Ich danke ihr für ihre Liebe und den Glauben an mich und dafür, dass sie sich während der gesamten Zeit so liebevoll um unsere Töchter gekümmert und mir den Rücken freigehalten hat.