

Aus dem Department für Pathobiologie
Der Veterinärmedizinischen Universität Wien
Institut für Virologie
(Leiter: Univ.-Prof. Dr.med.vet. Hans Tillmann Rümenapf)

**Konstruktion eines molekularen cDNA Klons des
PRRSV Feldisolats Aut14-440**

Diplomarbeit

Vorgelegt von Maximilian Winkler

Wien, Dezember 2019

Betreuer: Univ.-Prof. Dr.med.vet. Hans Tillmann Rümenapf
Institut für Virologie
Department für Pathobiologie
Veterinärmedizinische Universität Wien

Gutachter: Ao.Univ.-Prof. Dr.med.vet. Dieter Klein
Vetcore
Veterinärmedizinische Universität Wien

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich nochmal bei meinem Betreuer Till Rümenapf bedanken, welcher mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Es war bestimmt nicht immer einfach, mich und meine unzähligen Fragen auszuhalten. Till hat jedoch immer versucht Licht ins Dunkel zu bringen und die Verwirrung in meinem Kopf zu „entwirren“.

Weiters muss ich mich bei Katharina Buczolich, Benjamin Lamp, Hann-Wei Chen und Kerstin Seitz bedanken, ohne die die Durchführung der Versuche um Welten erschwert gewesen wäre. Vielen Dank für all die Erklärungen und die tröstenden Worte, wenn eine PCR wieder einmal nicht das gewünschte Ergebnis gebracht hat. Auch die tatkräftige Hilfe bei der Bekämpfung meines Erzfeinds „Microsoft Word“ muss hier herausgehoben werden. DANKE

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Einleitung | 1 |
| Familie der Arteriviridae | 1 |
| Aufbau des Genoms..... | 1 |
| Nichtstrukturproteine..... | 3 |
| Strukturproteine..... | 3 |
| Replikation und Translation | 4 |
| PRRSV | 5 |
| Arten der Infektion | 5 |
| Klinik | 6 |
| Symptomatik bei Sau und Eber..... | 6 |
| Symptomatik beim Ferkel | 7 |
| Impfstoffe und Bekämpfung PRRSV..... | 8 |
| cDNA-Klone | 8 |
| PRRSV Aut14-440 und Zielsetzung der Arbeit | 9 |
| Material und verwendete Methoden | 10 |
| Primer | 10 |
| Polymerase Kettenreaktion..... | 11 |
| High Fidelity PCR | 12 |
| Agarosegelelektrophorese | 13 |
| Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegel | 14 |
| Reinigung von DNA mit Hilfe von Anionenaustauschersäulen | 14 |
| Präparativer Verdau..... | 15 |
| Ligation | 16 |
| Transformation | 16 |
| Mini-Präparation..... | 17 |
| Midi-Präparation..... | 18 |
| Der analytische Verdau | 19 |
| Passagieren von Zellen | 20 |
| Synthese von Virus-RNA / Transkription | 21 |
| Elektroporation | 22 |
| Fixierung von Zellen mittels PFA und Färbung..... | 23 |
| Ergebnisse | 24 |
| Virusreinigung und RNA Extraktion..... | 24 |
| Strategie der Klonierungen | 24 |

| | |
|---|-----------|
| Bestimmung des 5` Endes von Aut14-440 | 24 |
| Bestimmung des 3` Endes von Aut 14-440..... | 26 |
| Klonierungen in den Plasmid-Vektor..... | 27 |
| 5'-Ende, M1 (pAX1) | 28 |
| Vordere Hälfte, M2 (pAX2)..... | 28 |
| Aufbau des Gesamtklons pAX3 | 30 |
| Herstellung des viralen Genoms und funktionelle Charakterisierung..... | 31 |
| Elektroporation und Transfektion | 32 |
| <i>Diskussion</i> | 34 |
| <i>Zusammenfassung</i> | 38 |
| <i>Summary</i>..... | 39 |
| <i>Abkürzungsverzeichnis</i>..... | 40 |
| <i>Abbildungsverzeichnis</i>..... | 42 |
| <i>Tabellenverzeichnis</i> | 43 |
| <i>Literaturverzeichnis</i>..... | 44 |

Einleitung

Familie der Arteriviridae

Die Familie der Arteriviridae, welche im Jahr 1996 etabliert wurde, wird von fünf Genera gebildet. Diese lauten wie folgt: Equartevirus (für das Pferde und Esel befallende Equine Arteritisvirus, kurz EAV), Porartevirus (Lactate-Dehydrogenase-Elevating Virus der Mäuse (LDV) + die beim Schwein vorkommende Porcine-Reproductive-and-Respiratory-Syndrome-Virus 1 und 2 (PRRSV)), Simartevirus (Simian-Haemorrhagic-Fever-Virus (SHFV) + Simian Arteriviren), Nesartevirus (für das Arterivirus der Riesenhamsterratte) und Dipartevirus (Brushtail-Arterivirus)

(SIB Swiss Institute of Bioinformatics. https://viralzone.expasy.org/28?outline=all_by_species (Zugriff: 25.10.2019)).

Die Erreger dieser Familie sind ausschließlich tierpathogen (Modrow et al. 2010). Gemeinsam mit den Coronaviridae sowie den Roniviridae zählt die Familie der Arteriviridae zur Ordnung der Nidovirales. Die Bezeichnung Nidovirales leitet sich aus dem Lateinischen ab, wo das Wort „nidus“ Nest bedeutet. Sie beruht auf einer besonderen Transkriptionsstrategie dieser Ordnung, bei welcher mehrere verschieden lange Messenger-RNA (mRNA) -Moleküle entstehen, welche in weiterer Folge wichtig für die Replikation des Virus sind (Tian et al. 2012).

Arteriviren werden als sphärische Partikel mit einem Durchmesser von 50 bis 60 nm und einer relativ glatten Oberfläche beschrieben. Die Nukleokapsidstruktur wird zum einen von dem 12,7 bis 15,7 Kilobasenpaare (kb) großen RNA-Genom, zum anderen von dem Nukleokapsid-Protein (N-Protein) gebildet (Snijder und Kikkert 2013).

Aufbau des Genoms

Die Genome der Familie der Arteriviren ähneln denen der Coronaviren im generellen Aufbau. Die Folge der codierenden Regionen liegt aber enger zusammen, sodass auch die Gesamtlänge der Genome dementsprechend kürzer ist. Sie umfassen Längen von ca. 12.000 Basenpaaren

(bp) bei EAV bis über 15.000 bp bei PRRSV beziehungsweise bei SHFV und stehen damit den bis zu 30.000 bp der Coronaviren deutlich in Länge nach (Meulenberg et al. 1998).

Die Virus-RNA, welche im Einzelstrang vorliegt und eine positive Polarität besitzt, weist am 5'-Ende eine methylierte Cap-Struktur auf und ist am 3'-Ende polyadenyliert (Li et al. 2012). Der codierende Bereich des 5'-Ende wird von 156 – 221 Nukleotiden flankiert, welche nicht zur Translation benützt werden. Diese Region wird auch als „untranslated region“ bezeichnet, kurz UTR (Tian et al. 2012). Eine solche UTR liegt am 3'-Ende mit einer Länge von 59 – 117 vor (Modrow et al. 2010). Arteriviren besitzen in der Regel 7 Leserahmen, sogenannte „open reading frames“ (ORF). Das Simian-Haemorrhagic-Fever-Virus bildet eine Ausnahme und besitzt 9 dieser ORFs (Snijder und Kikkert 2013).

Zwei von diesen Leserahmen, 1a und 1b, liegen überlappend vor. ORF1a beginnt am 5'-Ende und zusammen nehmen sie circa zwei Drittel des Gesamtgenoms ein. Sie sind für die Synthese von zwei Polyproteinen verantwortlich, 1a und 1ab, aus welchen in weiterer Folge durch proteolytische Spaltung die Nichtstrukturproteine (NSP) entstehen (Li et al. 2012). Das Polyprotein 1ab entsteht durch eine Verschiebung des Leserasters während der Translation. Im Zuge dessen wird ein Stopcodon überlesen und ORF1a und ORF1b werden gemeinsam durchgelesen (Sun et al. 2014). Auf diese Regionen, welche die Nichtstrukturproteine codieren, folgen die ORFs 2 – 7 (beim Simian-Haemorrhagic-Fever-Virus bis 9). Sie codieren für die Strukturproteine in folgender Reihenfolge: das Glykoprotein 2, das E-Protein, die Glykoproteine 3 bis 5, das Membranprotein M sowie das Nukleokapsidprotein N (Modrow et al. 2010, Tian et al. 2012).

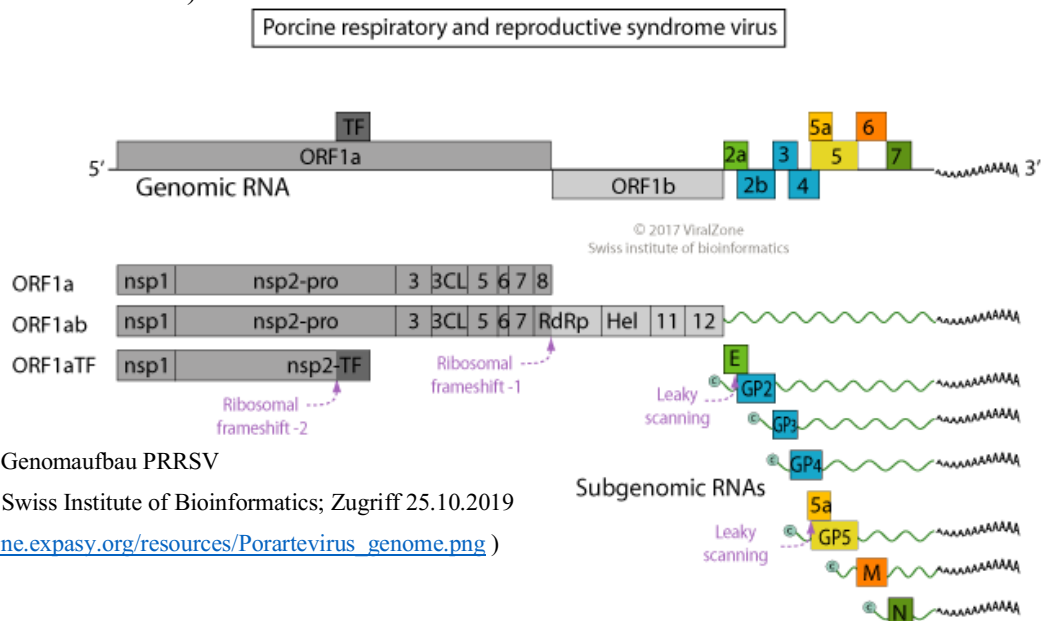


Abbildung 1 Genomaufbau PRRSV

(Quelle: SIB Swiss Institute of Bioinformatics; Zugriff 25.10.2019

https://viralzone.expasy.org/resources/Porartevirus_genome.png)

Nichtstrukturproteine

Während der Translation der mRNA entstehen zwei große Vorläufermoleküle der Nichtstrukturproteine; die bereits erwähnten Polyproteine pp1a und pp1ab. Die Molekularmasse von pp1a variiert dabei je nach Virusspezies zwischen 187 und 260 Kilodalton (kD). Das Polyprotein 1ab ist etwas größer und liegt im Bereich von 345 bis 421 kD. Die drei Proteasen NSP1, NSP2 und NSP4, welche im aminoterminalen Abschnitt der Vorläufermoleküle liegen, spalten diese in zwölf Nichtstrukturproteine, NSP 1 – NSP 12, deren exakte Funktion in einigen Fällen noch nicht eindeutig geklärt ist (Montaner-Tarbes et al. 2019).

NSP 1 und NSP 2 sind Cysteinproteasen, welche autokatalytisch abgespalten werden. NSP 2 ist sehr variabel, besonders die zentrale Region dieses Nichtstrukturproteins. Studien legen nahe, dass NSP 2 neben seiner Funktion, welche direkt mit der Replikation zusammenhängt, auch eine Art Immunantagonist darstellt. In diesen Studien wurde gezeigt, dass PRRSV ohne NSP 2 weniger in der Lage war, der angeborenen Immunantwort entgegenzuwirken oder auszuweichen (Li et al. 2018).

Die Serinprotease NSP 4 spaltet die Vorläuferproteine 1a und 1ab an bis zu acht weiteren Stellen. Durch ihre Aktivität entstehen unter anderem NSP 9 (eine RNA-abhängige RNA-Polymerase), ein metallionenbindendes Protein Membranprotein sowie NSP 10 (eine Helikase). Letztere ist besonders für die Bildung der viralen mRNA wichtig, da sie eine Zink-bindende Region enthält (Modrow et al. 2010). NSP 11 spielt, genau wie NSP 2, eine Rolle in der Modulation der Immunantwort des Wirts (Yang et al. 2019). Eine Studie aus dem Jahr 2019 zeigt, dass das Nichtstrukturprotein 12, welchem davor relativ wenig Aufmerksamkeit geschenkt wurde, essentiell für die Synthese von subgenomischer mRNA ist (Wang et al. 2019).

Strukturproteine

Im Bereich der Strukturproteine findet eine Unterteilung in Haupt- und Nebenproteine statt. Die Hauptproteine setzen sich aus dem Glykoprotein 5, dem Membranprotein M und dem Nukleokapsidprotein N zusammen (Snijder und Kikkert 2013). Zu den Nebenproteinen zählen demnach die Glykoproteine 2 – 4, sowie auch das E-Protein (J Wissink et al. 2005).

Membranprotein M und Glykoprotein 5 bilden Heterodimere, die Glykoproteine 2 – 4 bilden Heterotrimere (Thaa et al. 2013). Wird eines dieser Nebenproteine falsch oder gar nicht eingebaut, wird auch der Einbau der übrigen zwei verhindert. Dies ist auch der Fall, wenn das nicht glykosylierte E-Protein fehlt. Die genaue Funktion dieses Proteins ist noch nicht eindeutig bestimmt. Es wird vermutet, dass es sich um ein Ionenkanalprotein handeln könnte, welches für die Infektiosität von großer Bedeutung ist.

Das M-Protein der Arteriviridae besitzt den höchsten Konservierungsgrad unter den Strukturproteinen und ähnelt dem der Coronaviren sehr. Es passiert die Hüllmembran so, dass die carboxyterminale Region im Inneren des Virus liegt, während die aminoternale Domäne auf der Oberfläche zu liegen kommt (Modrow et al. 2010). Das N-Protein hat eine Größe von 12 – 15 kD und bildet gemeinsam mit dem RNA-Genom, an welches es gebunden ist, das Nukleokapsid. Alle Strukturproteine müssen vorhanden sein um infektiöse Partikel bilden zu können (Snijder und Kikkert 2013)

Replikation und Translation

Die bevorzugten Zielzellen der Familie der Arteriviren sind Makrophagen, im Fall von PRRSV genauer gesagt porcine Alveolarmakrophagen, kurz PAM. Mit Hilfe von rezeptorvermittelter Endozytose gelangen die Viren ins Zellinnere (Tian et al. 2012). Für diese Art der Infektion sind spezielle Rezeptoren auf der Oberfläche der Makrophagen notwendig. Sialoadhesin, „Cluster of Differentiation 163“ (CD163) und Heparansulfat haben sich als essentiell herausgestellt (Chen et al. 2014). Besonders CD 163 spielt eine wichtige Rolle in Bezug auf „uncoating“ und Freisetzung des viralen Genoms im Zytoplasma der Zielzellen (Li et al. 2015). Nach dem Eindringen ins Zellinnere und der Genomfreisetzung werden zuerst die beiden Polyproteine der Nichtstrukturproteine 1a und 1ab translatiert. Der Erfolg der Synthese von pp1ab hängt von einem „programmed ribosomal frameshift“ ab. Ausgehend von einer „slippery sequence“ (UUUAAAC) rutscht die kleinere Ribosomeneinheit um ein Nukleotid zurück und setzt die Translation in einem anderen Leserater fort. (Fang et al. 2012).

Durch proteolytische Spaltung kommt es zur Bildung von weiteren Nichtstrukturproteine, wie beispielsweise NSP 9 (RNA-Polymerase) und NSP 10 (Helikase), welche in weiterer Folge wichtig für die Synthese von neuer viraler RNA sind (Snijder und Kikkert 2013). Die genomische RNA wird im Anschluss von der Polymerase als Matrize herangezogen um einen

Gegenstrang zu synthetisieren. Dieses „Antigenom“ liegt in negativer Orientierung vor, umfasst das gesamte Genom und ist Matrize für die Synthese von neuer RNA, welche wiederum in positiver Polarität vorliegt. Weiters ist dieser Gegenstrang auch Ausgangspunkt für die Synthese von mindestens 6 mRNA-Spezies, die die einzelnen Strukturproteine kodieren. Die auf diese Art entstandenen subgenomischen mRNA – Sets („nested“) weisen untereinander, sowie mit der genomischen RNA, idente 3‘ – bzw. 5‘ – Enden auf. Diese Art der Transkription ist typisch für die Ordnung der Nidovirales (Modrow et al. 2010).

PRRSV

Das erstmals in den USA im Jahre 1987 beobachtete Krankheitsbild des „Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome“ (Li et al. 2012) wurde in Europa 1991, genauer gesagt in den Niederlanden, erstmalig isoliert und charakterisiert (Wensvoort et al. 1991). Anhand dieser Genom-Sequenzierung wurde deutlich, dass sich das in Europa vorkommende Virus um rund 40 % von dem in den Vereinigten Staaten verbreiteten Virus unterschied. Aus diesem Grund wurden zwei Genotypen unterschieden. Heutzutage haben diese ehemals als Typ 1 (Prototyp: Lelystad-Virus) und Typ 2 (Prototyp: VR-2332) bekannten Genotypen jeweils den Virus-Status erlangt, um diese deutliche Divergenz der beiden Genome mehr hervorzuheben (Kuhn et al. 2016).

Es existieren mehrere Hypothesen, wie es zu dieser Divergenz auf den beiden Kontinenten kommen konnte. In einigen spielt die Maus eine wichtige Rolle, da vermutet wird, dass es zu einem Wirtswechsel von der Maus auf das Schwein kam. Da das PRRS-Virus eine sehr hohe Mutationsrate besitzt, konnte es sich in den zwei separaten Schweinepopulationen zu den heute bekannten Viren entwickeln (Modrow et al. 2010).

Arten der Infektion

Schweinepopulationen können sich entweder über den horizontalen oder den vertikalen Weg infizieren. Bei der horizontalen Übertragung steht die Infektion über Aerosole im Vordergrund, jedoch kann auch der Kontakt mit infektiösem tierischem Material wie Blut, Speichel, Sekrete der Nase, Milch oder Sperma zu einer Ansteckung führen (Pileri und Mateu 2016).

In Versuchen konnte festgestellt werden, dass bereits nach 2 – 3 Tage *post infectionem* bis hin zu 92 Tagen Virus im Sperma nachgewiesen werden konnte. Weiters ist die Menge des über den Samen ausgeschiedenen Virus maßgeblich von der Rasse abhängig (Schulze et al. 2013). Dieser infizierte Samen kann dann entweder über den natürlichen Weg oder über die künstliche Besamung in die Sau gelangen und eine Infektion auslösen (Pileri und Mateu 2016). Doch nicht nur Gegenstände wie unsaubere Nadeln oder Katheter während der Insemination können das Virus ausbreiten. Kontaminierte Kleidung oder Schuhe, sowie nicht genügend gereinigte und desinfizierte Gerätschaften wie beispielsweise Traktoren tragen zu einer Ausbreitung von PRRSV bei. Sei es im Rahmen einer Neu- oder einer Reinfektion (Pitkin et al. 2009). Die Vertikale Übertragung findet meist im mittleren bis letzten Trächtigkeitsdrittel statt und erfolgt transplazentär von der Muttersau auf die Föten (Wang et al. 2015).

Typisch für PRRSV-Infektionen ist, dass selbst bei fehlender Klinik das Virus noch im Körper verweilt und ausgeschieden wird. In lymphatischen Geweben, wie beispielsweise Lymphknoten oder den Tonsillen ist Virus aufzufinden, jedoch mit verminderter Replikationsrate (Thaa et al. 2013, Bordet et al. 2019).

Klinik

Das klinische Erscheinungsbild von PRRS variiert stark zwischen Herden und wird durch Unterschiede in der Virulenz von PRRSV-Isolaten, sowie dem Immunstatus, dem Alter und der Empfänglichkeit des Wirts beeinflusst. Weiters spielen etwaig auftretende andere Infektion sowie Haltungs- und Managementfaktoren eine große Rolle (Sinn et al. 2016).

Symptomatik bei Sau und Eber

Infektionen von Sauen sind gekennzeichnet durch Appetitlosigkeit mit dadurch verbundenem Gewichtsverlust, verschlechtertem Allgemeinbefinden sowie Fieber bis 42 °C. Eine Blauverfärbung der Ohren, der Vulva oder dem Gesäuge ist ebenso zu beobachten (Senthilkumar et al. 2018). Der Ausgang der Infektion bei trächtigen Sauen und Jungsauen hängt weitgehend vom Stadium der Trächtigkeit ab. Im ersten Trächtigkeitsdrittel kann PRRSV den Embryontod verursachen, während das Virus in der Mitte der Trächtigkeit nicht ohne

weiteres die Transplazenta durchqueren kann und somit auch wenig bis keine Probleme hervorruft. PRRSV-Infektion im letzten Trächtigkeitsdrittel führt in der Regel zu einer transplazentaren Infektion der Föten und zu einer klinischen Manifestation, die durch Aborte, verfrühte Abferkelungen oder der Geburt lebensschwacher oder gar toter Ferkel gekennzeichnet ist. Der Hauptreplikationsort in den Föten ist der Thymus (Malgarin et al. 2019). Weiters ist auch die Sterblichkeit der überlebenden Ferkeln vor dem Absetzen erhöht (Ladinig et al. 2015).

Beim Eber kann eine Infektion mit PRRSV verschiedene Auswirkungen haben. Neben Inappetenz und generellen Störungen des Allgemeinbefindens, zählen beispielsweise eine verringerte Ejakulatmenge, reduziertes Sexualverhalten oder Sperma von minderer Qualität dazu. Diese Symptome sind aber nicht permanent, sondern auf einen Zeitraum von wenigen Wochen beschränkt. (Sur et al. 1997).

Symptomatik beim Ferkel

Die respiratorische Krankheitssymptomatik von PRRSV wird hauptsächlich bei Jungtieren beobachtet. Dabei werden neben den bereits bei den Sauen genannten „klassischen“ Symptomen wie Fieber, Gewichtsverlust und verminderten Tageszunahmen der Ferkel ausgelöst durch Inappetenz, auch Husten, Tachypnoe sowie Dyspnoe beobachtet (Haiwick et al. 2018). Durch die Infektion der Alveolarmakrophagen und der daraus resultierenden entzündlichen Reaktion der Lunge wird die Abwehrkraft dieser herabgesetzt und Sekundärerregern die Türe geöffnet. Erreger wie Porcines Circovirus Typ 2 (PCV-2), *Pasteurella Multocida*, *Haemophilus parasuis* können den Krankheitsverlauf verschlimmern und führen in der Regel zu erhöhten Mortalitätsraten (Dietze et al. 2011). Besonders die Coinfektion mit PCV-2 ist in diesem Zusammenhang hervorzuheben. Das gleichzeitige Vorhandensein dieser beiden Erreger bedingt eine erhöhte Virusreplikation und eine Verschlechterung der Klinik (Fan et al. 2013).

Impfstoffe und Bekämpfung PRRSV

Impfstoffe gegen PRRSV können als Tot-, oder als Lebendimpfstoffe vorliegen. Diese basieren auf PRRSV-1 oder PRRSV-2 (Renukaradhya et al. 2014). Eine Hürde in Bezug auf die Bekämpfung und Kontrolle von PRRSV-Infektionen stellt die hohe Variabilität des Erregers dar und seine Fähigkeit zu persistieren (Thaa et al. 2013).

Attenuierte Lebendimpfstoffe aktivieren im Organismus zusätzlich zu der humoralen Immunantwort, welche die Antikörperbildung umfasst, auch die zelluläre Immunantwort (T - Zellen). Diese Immunzellen sind in der Lage, bereits mit Virus infizierte Zellen im Organismus zu zerstören (Charerntantanakul 2012). Aus diesem Grund bieten Totimpfstoffe keinen so ausgeprägten Schutz, weil diese Zellen essentiell für die Elimination von im Zellinneren befindlichen Erregern sind. Ihr Einsatz führt bei bereits infizierten Tieren zu einem mildereren Verlauf, ein effektiver Schutz vor Infektion wird aber nicht geboten. Im Vergleich dazu, können Lebendimpfstoffe die Symptome der Krankheit erfolgreich reduzieren, jedoch scheiden geimpfte Tiere ungehindert mutiertes Virus aus, welches bei empfänglichen Tieren zu einer Erstinfektion führen kann (Renukaradhya et al. 2014). Aus diesem Grund wird diese Art der Impfstoffe eher im Bereich der Betriebssanierung im Rahmen einer Metaphylaxe eingesetzt.

cDNA-Klone

Das Verständnis über die biologischen Funktionen und die Virulenz bestimmter assoziierter Gene wurde bei RNA-Viren durch die Entwicklung sogenannter molekularer Klone maßgeblich beeinflusst. Diese Klone sind vollständige komplementäre DNA (cDNA) - Kopien der RNA-Genome.

Im Jahr 1998 wurde der erste solche Klon von PRRSV-1 (ehemals Typ 1, Prototyp: Lelystad-Virus) konstruiert (Meulenberg et al. 1998), im Jahr 2003 der erste von PRRSV-2 (Nielsen et al. 2003). Die Verfügbarkeit solcher cDNA-Klone bietet die Möglichkeit zur Analyse und Modifizierung viraler Genome auf molekularer Ebene und hat die Erforschung der Virusreplikation, Pathogenese und Impfstoffentwicklung stark unterstützt (Nielsen et al. 2003). Seit dem von Meulenberg et. al. veröffentlichten Klon aus dem Jahr 1998 wurden nur wenig neue Publikationen zu dem Thema verfasst. Dies ist zu einem großen Teil der Schwierigkeit der Klonierung geschuldet, welche durch neue Methoden deutlich vereinfacht wurde. Auch von

in Nordamerika beobachteten Ausbrüchen von PRRSV-1 wurden infektiöse cDNA-Klone entwickelt (Fang et al. 2006)

PRRSV Aut14-440 und Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel meiner Arbeit war die vollständige cDNA Klonierung des Genoms des PRRSV Isolats Aut14-440 sowie die funktionelle Prüfung der Infektiosität als Bestätigung der korrekten Sequenz. Das Interesse einen solchen cDNA-Klon von Aut14-440 zu konstruieren, ist in den Besonderheiten dieses Feldisolates begründet. Eine Probe von Aut14-440 wurde im Jahr 2014 auf einem Ferkelerzeugerbetrieb in Oberösterreich gezogen. Auf diesem Betrieb traten PRRSV-bedingte Probleme wie Lungenentzündung, Auseinanderwachsen, Bindehautentzündung und Husten bei Ferkelaufzucht sowie Reproduktionsstörungen wie Aborte oder die Geburt von lebensschwachen oder mumifizierten Ferkeln bei den Sauen auf. Bis zu diesem Ausbruch hatte der Ferkelerzeugerbetrieb einen negativen PRRSV-Status inne, die Verluste in einer Abferkelpartie waren bis zu 50 % hoch (Sinn et al. 2016a).

Dieses Feldisolat zeigt zum einen eine außergewöhnliche Deletion von insgesamt zwölf Aminosäuren im überlappenden Bereich der Glykoproteine 3 und 4, welche unter Selektionsdruck einen gewissen Vorteil darstellen könnte. Zum anderen eine besonders ausgeprägte klinische Symptomatik (Sinn et al. 2016).

Material und verwendete Methoden

Primer

Als Primer werden Oligonukleotide mit einer Länge von mind. 18 Basen bezeichnet, welche komplementär zu einer bestimmten Sequenz in einer Matrize der PCR sind und mit dieser hybridisieren. Beim Designen eines Primers sollte darauf geachtet werden, dass ein Anteil von ca. 40 – 60 % Guanidin und Cytosin (G+C) gegeben ist. Um Fehlhybridisierungen und Leserasterverschiebungen, sogenannte „frameshifts“, zu vermeiden, sollten nicht mehr als vier gleiche Basen aufeinander folgen (z.B. CCCC). Eine möglichst spezifische Sequenz für das Amplifikat ist gewünscht, um etwaige „falsche“ Amplifikationsprodukte aufgrund von Fehlhybridisierung mit Nicht-Zielsequenzen zu vermeiden. Denn mit steigender Zahl verwandter Sequenzen in der Template-DNA steigt auch die Wahrscheinlichkeit eben jener.

Die Schmelztemperatur der Primer sollte zwischen 55 °C und 80 °C liegen, um eine entsprechend spezifische Hybridisierung zu erreichen. Um eine optimale Bindung und Elongation zu gewährleisten, sollten sich am 3'-Ende ein bis zwei, maximal drei G oder C befinden. Weiters ist darauf zu achten, dass die verwendeten Primer nicht untereinander hybridisieren. Falls die Primer untereinander binden, wird die Menge an nutzbarem Primer deutlich reduziert und die Effizienz sinkt. Diese daraus entstehenden „Nonsens-Produkte“ nennt man Primer-Di- und Multimere (Mülhardt 2013). Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Primer sind in Tabelle 1 aufgelistet

Tabelle 1 Liste der verwendeten Primer.

| Primername | Sequenz | Richtung / Start |
|------------|--|-------------------------------|
| PRS 161 | GAGACCTCACCCACCGTCTC | forward / 7.623 bp |
| PRS 167 | CTGTGACCTGACGACTTCG | forward / 2.900 bp |
| PRS 184 | GGACAGCAATTACCGTTTGAGCAGA | revers / 4.280 bp |
| PRS 202 | ACGATTTAGGTGACACTATAG | forward / SP6-Promoter |
| PRS 240 | ATATATGCCCTCAAGGTGTC | forward / 14.133 bp |
| PRS 374 | GAAGATGGCTGAGAGCCAACAGCAC | revers / 500 bp |
| PRS 396 | GTAGGGGAATACCCTACACATCATCTATAGTGTACCTAAATCGC | revers / 25 bp. |
| PRS 397 | ATGATGTGTAGGGTATTTCCCCTACATAC | forward / 1 bp |
| PRS 398 | CACCTGAGGGATGCCGACAGAGACTCTC | revers / 427 bp |
| PRS 401 | GTCTGCCTTAGCGTCGCAG | revers / 9.335 bp |
| PRS 419 | CTGCGACGCTAAGGCAGACGTATAGTTTAAACCATAGTAG | forward / 9.317 bp |
| PRS 430 | CTGCGACGCTAAGGCAGACCATGCGTC | forward / 9.336 bp |
| PRS 431 | TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAATTCGGTCACATGGTTCCTG | revers / 15.019 bp |
| PRS 434 | GAACCATGTGACCGAAATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA | forward / 15.005 bp. |
| T 1 | GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTT | revers / homopolymerer A-tail |
| T 22 | GGCCACGCGTCGACTAGTAC | revers / homopolymerer A-tail |

Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion, kurz PCR, ist eine enzymbasierte Methode, mit welcher bestimmte DNA-Sequenzen vervielfältigt werden können. Dies geschieht im Zuge von mehreren Zyklen, die alle im Grunde aus drei Phasen bestehen: Einer Denaturierung, einem Annealing sowie einer Elongation. Nach jedem dieser Zyklen wurde die von den Primern begrenzte DNA-Sequenz verdoppelt.

Während dem ersten Schritt, der Denaturierung, wird die Temperatur auf 95 °C erhöht, was eine Spaltung der Wasserstoffbrücken zwischen den beiden DNA-Strängen zur Folge hat. In der nächsten Phase, dem Annealing, wird die Temperatur wieder bis zu einem gewissen Punkt

gesenkt, so dass es zur Bindung der im Überschuss vorhandenen Primer mit der in Einzelsträngen vorliegenden Template-DNA kommt. Die genaue Annealingtemperatur hängt von den verwendeten Primern ab. Genauer gesagt von der Anzahl und der Folge der vorkommenden Nukleotide. Diese liegt in der Regel zwischen 60 °C und höchstens 72 °C. Die Elongation bildet den letzten Schritt eines Zyklus, bei welchem die DNA-Polymerase die an die Matrize gebundenen Primer verlängert und so aus zwei Einzelsträngen wieder vollständige DNA-Doppelstränge kreiert. Dies geschieht bei einer Temperatur von 72 °C. Dieser Zyklus wird mehrfach wiederholt, um Millionen von exakten Kopien der gewünschten Sequenz zu erhalten.

Um die PCR korrekt durchführen zu können, benötigt man neben den oben genannten Reagenzien (Template-DNA, Primer, DNA-Polymerase) noch einen geeigneten Puffer, Nukleotide sowie Wasser. (Mülhardt 2013)

Wenn mehrere sehr ähnliche Versuchsansätze pipettiert werden müssen, wird zur Reduktion des Arbeitsaufwandes oft ein Mastermix hergestellt. Dieser enthält die Komponenten, die in allen Ansätzen ident sind (Puffer, Nukleotide sowie Wasser). Somit muss nur die sich unterscheidende Komponente hinzu pipettiert werden (die DNA beispielsweise).

High Fidelity PCR

Für alle PCRs, die im Rahmen dieser Arbeit gemacht worden sind, wurde der „2x Phanta Max Master Mix“ der Firma Vazyme Biotech verwendet. Die darin verwendete Polymerase basiert auf dem aus dem Archaeon „*Pyrococcus furiosus*“ stammendem Enzym Pfu-DNA-Polymerase. Sie weist im Vergleich zur Taq-Polymerase eine deutlich höhere Thermostabilität auf. Weiters besitzt sie eine 3′-5′-Exonuclease-Aktivität, welche eine Art Korrekturfunktion („proofreading“) erlaubt. (Mülhardt 2013)

Der Phanta Max Super-Fidelity DNA-Polymerase wurden außerdem zwei monoklonale Antikörper hinzugefügt, welche die 5′-3′ Polymerase Aktivität, sowie die 3′-5′ Exonuklease Aktivität bei Raumtemperatur hemmen.

(<http://www.vazymebiotech.com> , Zugang: 17.10.2019)

Dieser Master Mix enthält neben der bereits erwähnten Polymerase auch

Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) sowie ein für diesen Master Mix optimiertes

Puffer System. Somit müssen noch Primer und Template hinzu pipettiert werden und die Amplifikation kann beginnen.

Für eine Reaktion mit 50 µl Gesamtvolumen wurden folgende Reagenzien verwendet:

- 25 µl 2x Phanta Master Mix
- 20 µl H₂O (nukleasefrei)
- 2 µl Forward-Primer
- 2 µl Reverse Primer
- 1 µl Template-DNA (ca. 30 ng)

Tabelle 2 Einstellung des Thermocyclers

| Schritt | Temperatur | Zeit | Zyklusanzahl |
|-------------------------------|--------------|-------------|--------------|
| Initiale Denaturierung | 95 °C | 2 min | |
| Denaturierung | 95 °C | 15 sec | 30 |
| Annealing | 60 °C -72 °C | 15 sec | 30 |
| Elongation | 72 °C | 30-60sec/kb | 30 |
| Finale Elongation | 72 °C | 5 min | |
| Hold | 4 °C | ∞ | |

Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese ist es möglich, DNA-Fragmente bis zu einer Länge von 25 kb voneinander zu trennen und somit auch zu identifizieren. Im angelegten elektrischen Feld wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren in Richtung der positiv geladenen Elektrode. Die im Gel enthaltene Agarose, ein aus Algen gewonnenes Polysaccharid, wirkt als Molekularsieb und trennt die Nukleinsäuren ihrer Länge nach auf. Dieser Siebeffekt wird durch die verschiedenen großen Poren im Gel erreicht, welche größere Fragmente während ihrer Migration stärker behindern als kleinere (Clark und Pazdernik 2009, Mülhardt 2013).

Agarose löst sich nur in heißem Wasser und bei niedrigeren Temperaturen erstarrt sie. Diesen Effekt macht man sich im Labor zunutze und gießt die noch warme und flüssige Lösung in einen Gelschlitten. Bevor sie erhärtet schiebt man einen Kamm ein. Dieser wird dann aus dem festen Gel gezogen und es entstehen Taschen, in welche in weiterer Folge die Proben hinein pipettiert werden. Das erhärtete Gel wird in eine Elektrophoresekammer gegeben und soviel Elektrophoresepuffer darauf geleert, bis das gesamte Gel samt Taschen knapp bedeckt ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde peqGREEN der Firma Peqlab verwendet. Dieser Farbstoff interkaliert zwischen die Basenpaaren der DNA und diese fluoresziert in Folge dessen unter UV-Licht.

Den PCR Produkten wird etwas Loading Buffer zugegeben und diese werden in die vorgefertigten Taschen pipettiert. Um die Größe der Fragmente besser abschätzen und vergleichen zu können, wird gleichzeitig mit den Proben auch ein Größenstandard, eine sogenannte DNA-ladder, aufgetragen. In dieser sind DNA-Moleküle bekannter Größe vorhanden. Die entstehenden Banden sind, in regelmäßigen Abständen angeordnet (500 bp, 1 kb, etc.), unter UV-Licht zu sehen und erleichtern die Ermittlung der Größe ungemein. Die Dauer der Elektrophorese, sowie die angelegte Spannung, variiert je nach Länge der Fragmente.

Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegel

Hat man die gewünschte Bande auf dem Agarosegel identifiziert, muss man diese aus dem Gel isolieren, um damit weiter arbeiten zu können. Hierzu wird das mit peqGREEN gefärbte Gel auf einen UV-Transilluminator gelegt, unter dessen Licht die DNA fluoresziert. Anschließend kann das gewünschte Fragment vorsichtig mit einem Skalpell ausgeschnitten werden. Hier sollten alle jene Gelreste, welche nicht fluoreszieren, sprich keine DNA enthalten, entfernt werden. Weiters ist darauf zu achten, die UV-Licht-Exposition so kurz wie möglich zu halten, um Schäden wie beispielsweise Strangbrüche oder Depurinierungen an der empfindlichen DNA zu vermeiden. (Mülhardt 2013)

Reinigung von DNA mit Hilfe von Anionenaustauschersäulen

Anionenaustauscher bestehen aus einer positiv geladenen Matrix, welche in den meisten Fällen Cellulose oder Dextrose beinhaltet. Nukleinsäuren besitzen ein Phosphatrückgrat, welches, bei einem pH-Wert von mehr als 2, negativ geladen ist. Aus diesem Grund werden sie an die Säule

gebunden. Bei den Versuchen zu dieser Arbeit wurde das Monarch® DNA Gel Extraction Kit der Firma New England Biolabs verwendet.

Im ersten Schritt wird das ausgeschnittene Gelstück gewogen und in ein geeignetes Tube überführt. Dem Stück wird die vierfache Menge an Dissolving Buffer beigegeben (400 µl Dissolving Buffer für ein 100 µg schweres Gelstück). Nun wird die Probe bei 37 °C im Thermomixer inkubiert und zwischendurch gemischt, bis sich die Agarose komplett gelöst hat. Dieser Vorgang dauert in der Regel 5 – 10 Minuten. Im nächsten Schritt wird die gesamte Lösung auf die Säule gegeben und bei 13.000 „revolutions per minute“ (rpm) für 1 Minute zentrifugiert. Der Durchlauf wird verworfen und die DNA liegt nun gebunden an die Matrix der Säule vor. Jetzt werden im darauffolgenden Wasch-Schritt die letzten Verunreinigungen gelöst und ausgewaschen. Hierzu wird die Säule mit 200 µl Wash Buffer beladen und wiederum für 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wird daraufhin wiederholt. Zur restlosen Entfernung etwaiger Pufferreste wird die Säule noch einmal „leer“ zentrifugiert. Nun wird diese auf ein frisches 1,5 ml Tube überführt. Um Verunreinigungen zu vermeiden, ist hier darauf zu achten, dass die Spitze der Säule nicht mit dem Durchlauf in Berührung kommt. Geschieht dies doch, wird noch einmal zentrifugiert. Im letzten Schritt der DNA-Reinigung werden mind. 6 µl Elution Buffer oder nukleasefreies H₂O direkt auf die Membran pipettiert. Nach einer Inkubation von einer Minute, wird ein letztes Mal zentrifugiert. Die DNA liegt nun im Durchlauf gelöst vor und die Säule kann verworfen werden.

Präparativer Verdau

Zum Schutz vor Fremd-DNA besitzen viele Prokaryonten sogenannte Restriktionsenzyme, welche auch Restriktionsendonukleasen genannt werden. Diese spalten DNA an verschiedenen definierten Stellen und können beispielsweise so Bakterien einen gewissen Schutz vor einer Infektion mit Bakteriophagen bieten. Diese Eigenschaft der Enzyme macht man sich in der Molekularbiologie, besonders beim präparativen Verdau zu Nutze. Sowohl Insert als auch Vektor besitzen dieselben Schnittstellen an denen die Restriktionsenzyme „arbeiten“ können. Während dem Verdau entstehen an jenen Stellen sogenannte „sticky ends“. Diese sind nichts anderes als Überhänge an den 3` bzw. 5` Enden der aufgeschnittenen DNA, die komplementär zu einander sind. Nach dem Verdau kann man das Insert in die Multiple Cloning Site (MCS) des Vektors einfügen. Dieser Vorgang wird auch Legation genannt.

Für einen Ansatz werden 2,5 µg DNA mit je 1 µl der beiden verwendeten Restriktionsenzyme sowie 3 µl Puffer in ein Tube überführt und mit H₂O auf 20 µl aufgefüllt. Nach der Inkubationszeit von einer Stunde bei 37 °C, kann der gesamte Ansatz, mit etwas loading-buffer zugesetzt, auf ein präparatives Gel aufgetragen werden. Die Taschen eines solchen Gels sind größer und fassen in etwa 40 µl. Anschließend wird es bei 50 V für 60 Minuten, also bei niedrigerer Spannung und etwas langsamer als bei einer „normalen“ Gelelektrophorese, laufen gelassen. Im Anschluss daran können die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht, sowie ausgeschnitten werden.

Ligation

Die Ligation stellt eine enzymkatalysierte Reaktion dar, bei der DNA-Fragmente miteinander verknüpft werden können. In unserem Fall sind diese Fragmente das Insert und der Vektor. Damit diese Verknüpfung gut funktionieren kann, ist ein erfolgreicher präparativer Verdau Voraussetzung.

Für einen Gesamtansatz von 10 µl werden 5 µl NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix der Firma New England Biolabs mit 50 – 100 ng Vektor und 100-200 ng Insert vermischt. Sollten diese drei Reagenzien noch nicht 10 µl ergeben, wird mit H₂O aufgefüllt. Die Probe wird für 15 Minuten bei 50 °C im Heizblock inkubiert und darauffolgend für 10 Minuten auf Eis gestellt.

Transformation

Das Einbringen von Fremd-DNA in Bakterienzellen wird Transformation genannt. Voraussetzung dafür sind sogenannte transformationskompetente Bakterien. Diese, beispielsweise *Escherichia Coli* (E. Coli), werden durch Behandlung mit chemischen Verbindungen wie Calciumchlorid oder Rubidiumchlorid erzeugt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden kompetente E.Coli vom HB101-Stamm für die Versuche verwendet. Diese werden auf Eis, für maximal eine Stunde, aufgetaut mit 10µl des Ligationsansatzes vermischt. Nach weiteren 20 min Inkubation auf Eis, folgt ein Hitzeschock für 1 min 30 sek bei 37 °C im Heizblock. Nach Verstreichen dieser Zeit, werden die Bakterien sofort wieder für 3 min auf Eis überführt. Zu den nun wieder gekühlten Bakterien werden 200 µl ampicilinfreies LB-Medium

gegeben und der Gesamtansatz wird für 20 – 30 min bei 37 °C und 700 rpm im Heizblock geschüttelt. Im finalen Schritt wird der Ansatz auf einer ampicilinhaltigen LB-Platte ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C bebrütet.

Mini-Präparation

Durch alkalische Lyse von Bakterienzellen mit darauffolgender Präzipitation kann Plasmid-DNA gewonnen werden (Birnboim und Doly 1979). Diese Methode ist heutzutage Standard, weil mit der so gewonnenen DNA gut und vor allem schnell weitergearbeitet werden kann.

Auf den über Nacht bebrüteten Platten sollten sich nun Einzelkolonien befinden, die zur Gewinnung von Plasmid-DNA herangezogen werden können. Jede dieser Einzelkolonien wird mit einer kleinen Pipettenspitze vorsichtig aufgenommen und diese wird in ein Kulturröhrchen aus Glas mit Aluminiumdeckel abgeworfen, das mit 2,5 ml ampicilinhaltigen LB-Medium gefüllt ist. Diesen Kulturen wird nun über 12 Stunden bei 37 °C im Schüttler Zeit gegeben um zu wachsen und eine optische Dichte von etwa 1 zu erreichen. Nach Ablauf dieser Zeit, werden je 2 ml der Bakterienkulturen aus den Kulturröhrchen in Eppendorf Tubes überführt und bei Raumtemperatur für eine Minute zentrifugiert (13.000 rpm). Nun kann der Überstand vorsichtig mit Hilfe einer Vakuumpumpe abgesaugt werden. Den in den Tubes verbleibenden Pellets wird jetzt 200 µl Puffer 1 (50 mM Tris + 0,1mg/ml RNase A (pH=8,0)) zugegeben und resuspendiert bis sich das Pellet komplett gelöst hat. Nach Zugabe von 200 µl Puffer 2 (0,2 M NaOH + 1% SDS (Natriumdodecylsulfat)) werden die Tubes vorsichtig 5 – 6x über Kopf geschwenkt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch das Eintreten der Bakteriolyse erhalten die Proben eine muköse Konsistenz. Anschließend werden 200 µl Puffer 3 (2,55 M KaAc, pH=5,5) hinzu pipettiert, gut geschwenkt und für 5 min bei Raumtemperatur und 13.000 rpm zentrifugiert. Während diesem Schritt kann bereits in frische 1,5 ml Tubes 500 µl Isopropanol vorgelegt werden. In weiterer Folge wird, nach Abschluss des Zentrifugierens, der Überstand vorsichtig abgenommen und zum Isopropanol pipettiert. Das hat ein Ausfallen der Plasmid-DNA zur Folge. Nach erneutem Zentrifugieren für 1 min bei 13.000 rpm wird dem Pellet 100 µl Ethanol zugegeben und ein letztes Mal zentrifugiert. Der Überstand wird wieder vorsichtig abgesaugt und die Eppendorf Tubes für 3 – 5 min mit offenem Deckel in den Thermomixer gestellt, bis der letzte Ethanolrest verdampft ist. Im finalen Schritt wird dem

Pellet noch 25 µl H₂O zugegeben und zur Resuspendierung für 10 min bei 37 °C und 700 rpm in den Thermomixer gestellt. Die so entstandene Plasmid DNA wird bei -20 °C gelagert.

Midi-Präparation

Die Vorgehensweise sowie die Reagenzien sind im Prinzip ident mit der Mini Präparation, es werden lediglich größere Mengen an DNA gewonnen. Im Zuge dieser Arbeit, wurde das „Plasmid Mini Kit“ der Firma Favorgen verwendet. Im ersten Schritt wird mit einer dünnen Pipettenspitze eine Bakterienkolonie von einer Platte aufgenommen und in einen mit ca. 100 ml LB-Medium gefüllten Glaskolben überführt. Dieser Ansatz kann über Nacht bei 37°C zu einer dichten Kultur anwachsen. Am nächsten Tag werden 15 ml dieses Ansatzes in ein Gefäß gekippt und anschließend für 10 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Dabei setzt sich das Bakterienpellet am Boden des Gefäßes ab und der Überstand kann verworfen werden. Nun wird das Pellet in 400 µl FAPD1-Puffer (+RNase A) resuspendiert und der gesamte Inhalt in ein 2 ml Eppendorf-Tube gegeben. 400 µl FAPD2-Puffer werden zugegeben und nach 5 – 10x Invertieren für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird der Ansatz durch die Zugabe von 600 µl FAPD3-Puffer neutralisiert, wiederum kurz geschwenkt und für 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Nun kann die im Kit mitgelieferte Säule mit 700 µl Lysat beladen und für 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugiert werden. Der Durchfluss wird im Anschluss daran verworfen. Dieser Schritt wird solange wiederholt, bis kein Lysat mehr vorhanden ist. Im ersten der darauffolgenden Waschschrte wird die Säule mit 400 µl W1 Puffer beladen und wiederum zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchflusses werden 700 µl Wash Buffer (+EtOH) hinzugegeben und wie in den Schritten zuvor für 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Um wirklich alle Reste der Puffer aus der Matrix zu lösen wird die Säule noch einmal leerzentrifugiert. Nun wird die trockene Säule auf ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Tube gegeben und 100 µl H₂O direkt auf die Matrix pipettiert. Nach einer Minute Inkubationszeit wird ein letztes Mal für eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Die DNA liegt nun im Durchfluss vor und die Säule kann verworfen werden. Die gewonnene Plasmid-DNA-Menge kann nun mit Hilfe der Spektralphotometrie ermittelt werden. Diese Menge wird auf dem Tube notiert und mit durchsichtigem Klebeband überklebt, um ein versehentliches Ver- bzw. Abwischen zu vermeiden.

Der analytische Verdau

Um die präparierten Plasmide auf ihre Richtigkeit zu prüfen, macht man sich wieder die Wirkung von Restriktionsenzymen zu Nutze. Diese schneiden die DNA in gut darstellbare Fragmente. Da man mittels Computerprogrammen genau feststellen kann, an welchen Stellen ein gewisses Enzym schneidet, weiß man auch die Länge der daraus resultierenden Fragmente. Mit Hilfe der Gelelektrophorese werden diese Fragmente voneinander getrennt und anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit der „richtigen“ Länge verglichen.

Werden mehrere Proben gleichzeitig verdaut, setzt man zuerst einen Mastermix für die Gesamtreaktion von 10 µl pro Probe an. Hier ein Beispielansatz eines Mastermix für 12 Proben. (12 Proben, Ansatz für 13 Proben je 10µl/Probe)

- 87,0 µl H₂O dd
 - 13,0 µl 10x Puffer NEB
 - 2,0 µl Restriktionsenzym 1
 - 2,0 µl Restriktionsenzym 2
-
- 104,0 µl Gesamtvolumen Mastermix
- + 26,0 µl Plasmid-DNA (13x 2µl Plasmid-DNA)
-
- 130,0 µl Gesamtvolumen

Anschließend werden je 8 µl des Mastermix in eine 96-well Testplatte vorgelegt und je 2 µl Plasmid-DNA dazugegeben. Die verwendeten Vertiefungen der Platte werden mit Klebeband zugleibt, um die Proben vor Verdampfung während des Verdau zu schützen. Dieser dauert 45 Minuten lang und wird bei 37 °C durchgeführt. Nach Ablauf dieser Zeit werden in jede benützte Vertiefung 2 µl Loading Buffer zugegeben und die gesamten Proben auf ein Gel aufgetragen. Nach 20 – 30 min bei 100 V wird die Elektrophorese gestoppt und die Banden können auf ihre Richtigkeit überprüft werden.

Passagieren von Zellen

Grundsätzlich ist zu sagen, dass sämtliche Arbeiten mit Zellen und Zellkulturen unter Sicherheitswerkbänken durchgeführt werden sollten, um Kontaminationen bestmöglich vorzubeugen. Weiters müssen die Hände desinfiziert und Handschuhe getragen werden.

Binnen einiger Tagen wachsen Zellen zu einem konfluenten Rasen aus. Dies ist von Zelllinie zu Zelllinie unterschiedlich. Doch was nach Erreichen dieser Maximaldichte in der Regel für alle adhären Zellen gleich ist, ist die Tatsache, dass sie nicht mehr weiterwachsen. Aus diesem Grund müssen sie aus dem Monolayer herausgelöst, suspendiert, verdünnt und schließlich wieder in neue Kulturgefäße überführt werden (Gstraunthaler und Lindl 2013). Vor dem Passagieren der Zellen werden sie makro- sowie mikroskopisch beurteilt. Das Medium kann mit unbewaffnetem Auge auf etwaige Farbveränderungen überprüft werden. Diese geben beispielsweise Aufschluss über Kontaminationen oder die richtige CO₂ Konzentration im Inkubator. Unter dem Mikroskop kann die Zellkultur nun genauer auf Kontaminationen überprüft werden. Liegen solche vor, wird die Kultur verworfen. Weiters kann die Konfluenz des Zellrasens bestimmt werden (Bei ca. 90 % werden die Zellen passagiert). Im Anschluss daran, wird das komplette Medium sorgfältig entnommen und 5 ml Trypsinlösung (2,5g/l Trypsin, 16 mg/l Phenolrot, 3,3 mM EDTA in „phosphat buffered saline“ (PBS)) beigegeben und kurz geschwenkt, um alle Zellen mit der Lösung zu bedecken. 4,5 ml des Trypsins werden sofort wieder abgenommen und die Schale zur Inkubation bei 37 °C in den Brutschrank gestellt. Die Dauer dieser Inkubation hängt von der gewählten Zelllinie ab, in der Regel etwa 10 Minuten. Liegen die Zellen nun vereinzelt und abgelöst vor (mikroskopische Kontrolle), werden sie mit 9,5 ml Nährmedium mehrmals gespült und resuspendiert. Die gesamte Suspension wird nun mit einer Pipette aufgenommen und eine bestimmte Menge in eine neue Schale, in welcher bereits 10 ml Medium vorgelegt wurden, pipettiert. Diese Menge hängt von dem gewünschten Verdünnungsgrad der Zellen ab und reicht von 0,25 ml bei einer 1:40-Verdünnung bis zu 3,3 ml bei einer 1:3-Verdünnung. Der Rest der Zellsuspension wird in Gefäße überführt, diese werden beschriftet, und für einen Tag bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Die frisch ausgesäten Zellen werden bei 37 °C in den Brutschrank gestellt, bis auch sie wieder einen konfluenten Monolayer bilden.

Synthese von Virus-RNA / Transkription

Um in weiterer Folge Zellen erfolgreich transfizieren zu können, müssen der nun als Plasmid-DNA vorliegende Gesamtklon erst in RNA „umgeschrieben“ werden. Als erster Schritt muss die DNA dafür linearisiert werden. Dies geschieht durch einen Verdau mit speziellen Enzymen (SmaI bzw. AclI). Ein Beispielansatz:

- 2 µl-10x Puffer NEB
 - 10 µl Plasmid-DNA (2,5µg oder 10µl Mini Plasmid-DNA)
 - 7 µl H₂O
 - 1 µl SmaI (bzw. AclI, 10-15 units)
 - 20 µl Gesamtvolumen
-

Dieser Ansatz wird nun für mindestens eine Stunde bei 25 °C für den SmaI-Verdau (bzw. bei 37 °C für den AclI -Verdau) inkubiert. Nach 30 min wird 1 µl entnommen und ein Testgel, zur Überprüfung der Richtigkeit, laufen gelassen (135V für 20 min). Nach abgeschlossener Inkubation wird die Transkription mit folgenden Reagenzien gestartet:

- 5 µl nukleasefreies H₂O
 - 1 µl 10x Transkriptionspuffer (Sp6-Puffer, diesen kurz vortexen wegen eventuell ausgefallener Salze)
 - 1 µl 10mM CAP/rNTP-Mix
 - 1 µl 100mM DTT
 - 0,5 µl sp6-RNA-Polymerase
 - 0,5 µl RNase-Inhibitor
-
- 9,0 µl Mastermix
-
- 1µl ungereinigter Verdau (Template)
-
- 10,0µl Gesamtvolumen

Um in weiterer Folge die Elektroporation zu erleichtern, wird der neu synthetisierten RNA schon im Zuge dieser Transkription ein Poly-A-tail angehängt. Nach 10 Minuten wird dem Ansatz noch 1 µl Ribonucleosid-Triphosphat (rNTP) - Mix zugegeben, um die Synthese vollständiger RNA Transkripte zu verbessern und weitere 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach einer halben Stunde wird mit 1 µl des Transkriptionsansatzes ein weiteres Mal ein Testgel laufen gelassen (100V / 15 Minuten). Nun kann die RNA weiterverwendet werden oder bei -70 °C gelagert werden.

Elektroporation

Mit Hilfe der Elektroporation ist es möglich, Zellmembranen vorübergehend permeabel zu machen und so DNA oder RNA in eukaryotische Zellen einzuschleusen (Transfektion). Dies geschieht durch einen elektrischen Puls, welcher vom Entladungsstrom eines Kondensators gebildet wird. Aufgrund der Störung des Membranpotenzials, beispielsweise durch Konformationsänderungen von Bestandteilen der Membran, wird diese kurzzeitig permeabel. In dieser Zeit ist es für die DNA/RNA möglich ins Innere der Zelle überzutreten, vermutlich durch Diffusion. (Mülhardt 2013) Dieser Effekt wurde erstmalig von Neumann im Jahr 1982 dokumentiert und beschrieben. (Neumann et al. 1982)

Die Zellen, welche auf einer Platte mit 10 cm Durchmesser angewachsen sind, werden mit Trypsin abgelöst und in 10ml Medium aufgenommen. Diese Suspension wird für 2 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert, wodurch sich am Boden des 15ml Zentrifugenröhrchens ein Zellpellet bildet. Der Überstand wird abgenommen, das Pellet in 5 ml PBS resuspendiert und wiederum für 2 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Nun wird abermals der Überstand vorsichtig abgenommen und die Zellen in 300 µl PBS durch vorsichtiges Pipettieren resuspendiert. Die gesamte Zellsuspension wird nun mit 10 µl Transkript vermischt, etwas „durchpipettiert“ und in eine 0,2 cm Elektroporationsküvette gegeben. Diese wird nun in den Elektroporator gestellt und es wird ein Puls ausgelöst (Widerstand: ∞, Kapazität: 950 µF, Spannung: 0,18 kV). Im Anschluss daran, werden in die Vertiefungen einer „6 well“-Platte 2 ml Medium vorgelegt. 1 ml dieses Mediums wird aufgenommen und die Zellaggregate, welche während der Elektroporation entstanden sind, werden darin resuspendiert. Anschließend wird die gesamte Suspension aus der Küvette wieder in eine Vertiefung zurückgegeben und die Platte wird für 24 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Fixierung von Zellen mittels PFA und Färbung

In Folge der Fixierung und Färbung der Zellen ist es möglich nachzuweisen, ob die Elektroporation erfolgreich war und wirklich Virus-RNA in die Zellen eindringen konnte. Zuerst wird das gesamte Medium aus den Vertiefungen der 6 well Platte genommen und diese einmal mit PBS gewaschen. Dann werden die elektroporierten Zellen mit 4 °C kaltem Paraformaldehyd (PFA, 4%) bedeckt und für 20 Minuten zur Fixierung, wiederum bei 4 °C, in den Kühlschrank gestellt. Im Anschluss daran wird das PFA wieder abgenommen und die Zellen werden 2-mal mit PBS gewaschen. Um eine optimale Antikörperbindung zu gewährleisten, müssen die Zellen erst mit Triton X-100 (1% in PBS) bedeckt werden. Das hat ein Lysieren der Zellen zur Folge. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wird das Triton X-100 wieder abpipettiert und die Zellen wiederum 2-mal mit PBS gewaschen. Hier ist darauf zu achten, dass die Zellen nicht austrocknen. Nun kann der Primärantikörper hinzugefügt werden, welcher an das virale N-Protein bindet. Diese Bindung geschieht während einer Inkubationszeit von 30min – 1h bei 37 °C im Brutschrank. Die Antikörperlösung wird abgenommen und die Zellen 3-mal mit PBS/Tween gewaschen. Durch diesen Schritt werden alle Antikörper, die nicht spezifisch gebunden sind, entfernt. Um die Zellen, welche Virus und somit auch Primärantikörper enthalten, aufzuspüren, wird der Sekundärantikörper (Ziege-anti-Maus gekoppelt mit einem Fluoreszenzfarbstoff) zugegeben. Dieser bindet während einer erneuten Inkubation von 30min – 1h bei 37 °C. Anschließend werden die Zellen 3-mal mit PBS/Tween gewaschen und danach mit PBS bedeckt, um eine Austrocknung der Zellen zu verhindern. Die Färbung und somit auch der Erfolg der Transfektion der Zellen kann nun unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt werden (alle virusbeihaltenden Zellen weisen eine rote Färbung auf). Zu Ihrer Detektion werden alle Monolayer mäanderförmig abgesucht.

Ergebnisse

Virusreinigung und RNA Extraktion

Ausgangspunkt für die cDNA Klonierung ist qualitativ hochwertige genomische Virus RNA. Um diese zu gewinnen, wurden 10^8 porcine Alveolarmakrophagen mit einer Multiplizität der Infektion (MOI) von 0,01 mit Aut14-440 Virus infiziert. Nach 4 Tagen waren 90 % der Zellen zerstört und das virushaltige Zellkulturmedium wurde geerntet. Zur Extraktion der viralen RNA wurden 50 ml des Aut14-440 haltigen Mediums durch Zentrifugation und Filtration von Zelltrümmern befreit und anschließend das PRRSV durch Ultrazentrifugation (Rotor 50.2 Ti, $105.000 \times g$ für 2h) konzentriert. Aus dem pelletierten Virus wurden 2 μ g RNA gewonnen.

Strategie der Klonierungen

Für die cDNA Klonierungen wurde folgendermaßen vorgegangen:

1. Ermittlung des korrekten 5' Endes,
2. Ermittlung des korrekten 3' Endes und
3. Klonierung möglichst langer zusammenhängender cDNA Fragmente.

Bestimmung des 5' Endes von Aut14-440

Um das 5'-Ende der cDNA genau bestimmen zu können, wurde ein „rapid amplification of cDNA-ends“ (5' RACE) Verfahren angewendet. Hierbei werden das 5'-Ende der RNA mehrere homopolymere Adenin-Nukleotide durch terminale Transferase angehängt (poly-A Adapter). Die DNA mit EtOH wurde im Anschluss in H_2O gelöst und diente als Vorlage für die folgende PCR.

Als Primer für diese Reaktion wurden PRS 374 und T1 verwendet. Ersterer liegt genintern bei ca. 500 bp, der T1-Primer bindet an dem angehängten homopolymeren A-tail. Somit ergibt sich auch eine erwartete Stücklänge von 500 bp. Diese Bande war unter UV-Licht auch deutlich zu erkennen.

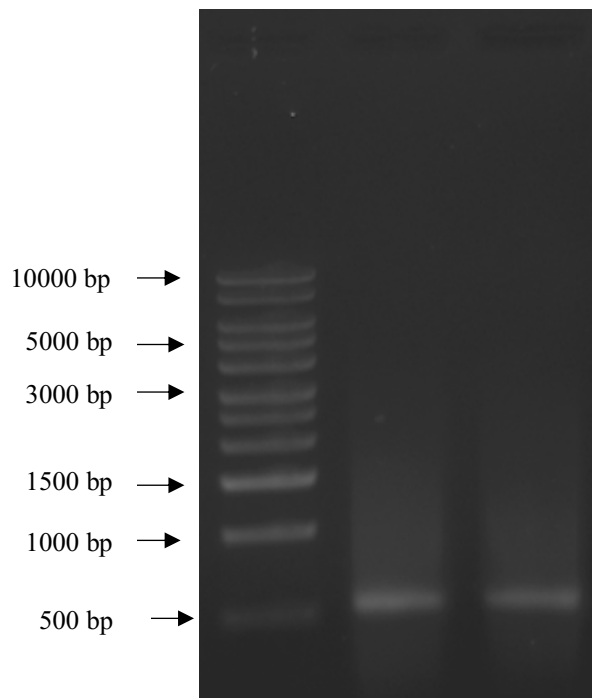


Abbildung 2 Agarosegelelektrophorese: Bestimmung 5'-Ende
Spur 1: Größenstandard; Spuren 2 und 3: cDNA mit PRS 374 + T1

Das PCR-Produkt aus der zweiten Tasche wurde mittels PCR Purification Kit gereinigt, in H₂O eluiert und sequenziert.

Die durch das 5' RACE bestimmte Sequenz lautet

```
5' ATGATGTGTAGGGTATTTCCCCTACATACACAACACTCTTAGTGTTTGTG
TGCCTTGGAGGCGTGGGTACAGCCCCGCCACCCCTTGGCCCCTGTTCT
AGCCCAACAGGTATCCTCCTCCCTCGGGGCGAGTGTGCCGCCGCCGCTT
CCTTGCAGCGGAAGGACCTCCCGAGTATTTCCGGAGAGCACCTGCTTTA
CGGGATCTCCACCCTTAAACCATGTCTGGGACGTTCTCCCGGTGCATGTG
CACCCCGGCTGCTCGGGTATTTTGGAAACGCCGGTCAAGTCTATTGCACAC
GGTGTCTCAGTGC GCGGCCCTCTCCTCCCTCCAGAGCTCCAGGACACTGAT
CTCGCCGCTATTGGCCTATTTACAAGCCAAAGACAAGCTCCACTGGAG
AGTCTCTGTGCGCATCCCTCAGGTGGAGTGC ACTCCGTCCGGGTGCTGTT
GGCTCTAGCCATCTCCCCTTGGCACGCATGACCTCCGTAATCACAAC
```

und entspricht der publizierten Sequenz. Diese Information ist wichtig für den ordnungsgemäßen Zusammenbau des infektiösen Klons.

Bestimmung des 3' Endes von Aut 14-440

Nach erfolgreicher Bestimmung des 5'-Endes von AUT14-440 lag der Fokus nun auf der korrekten Ermittlung des 3'-Endes. Um die nachfolgenden Arbeitsschritte zu vereinfachen und um richtige Ergebnisse der Klonierungen gewährleisten zu können, wurde das Genom von AUT- 14-440 in zwei Teile geteilt. Diese beiden Hälften wurden separat voneinander bearbeitet und erst in einem späteren Schritt wieder vereint. Begonnen wurde mit der hinteren (3') Hälfte des Genoms (ca.7.600 – 15.100 bp).

Als Primer für diese Reaktion dienten PRS 161 (7623 forward) und T22 (revers vom homopolymeren A-tail). Das verwendete Template war wiederum cDNA. Zur Überprüfung der Reaktion und zur Amplifikation des 3'-Endes wurde ein weiterer PCR-Ansatz durchgeführt. In dieser Reaktion dienten PRS 240 (14133 forward) und wieder T22 als Primer.

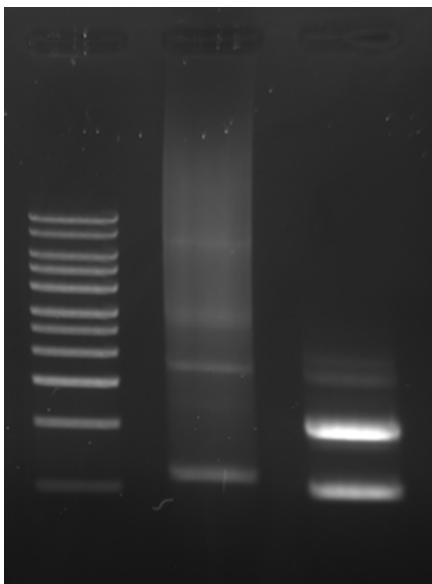


Abbildung 3 Agarosegelelektrophorese

Spur 1: Größenstandard; Spur 2: cDNA mit PRS 161 und T22; Spur 3: cDNA mit PRS 240 und T22

In der zweiten Spur war eine schwache Bande zwischen der 7kb- und 8kb- Marke des DNA-Größenstandards erkennbar. Die oben genannte Überprüfung dieser Reaktion war ebenso erfolgreich, da die erwartete Bande knapp unterhalb der 1000bp deutlich zu erkennen war (Spur 3).

Zur genauen Bestimmung des 3`-Endes wurde das Produkt aus der Reaktion von Spur 3 über ein Gel laufen gelassen, ausgeschnitten, mittels Gel-Purification Kit aufgereinigt und im Anschluss daran mit dem Primer PRS 240 sequenziert.

Klonierungen in den Plasmid-Vektor

Zur Veranschaulichung und zum besseren Verständnis der durchgeführten Klonierungen wurden die folgenden Schemata erstellt.

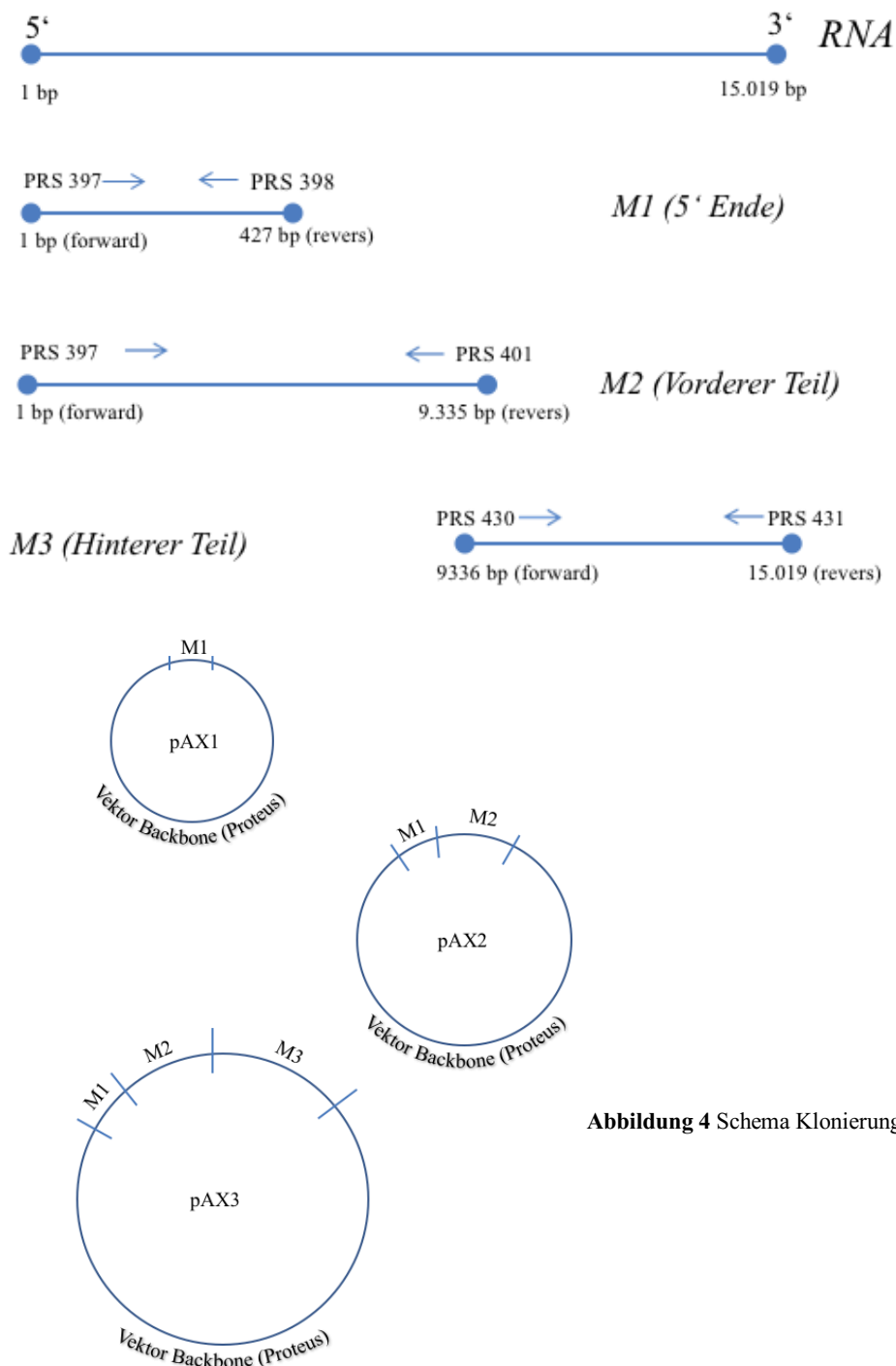


Abbildung 4 Schema Klonierungsschritte

5'-Ende, M1 (pAX1)

Da nun das korrekte 5'- sowie das korrekte 3'-Ende bekannt sind, konnte mit der Klonierung in Vektoren begonnen werden. Der erste Schritt war das Einfügen eines Fragments, welches das 5'Ende beinhaltet, in einen Proteus-Abkömmling. Dieses wurde M1 benannt. Die Primer die zur Synthese von M1 verwendet wurden, waren PRS 397 (1 forward) und PRS 398 (427 revers).

Dieses Insert, sowie der verwendete Vektor (Proteus-Abkömmling) wurden über ein Gel laufen gelassen und unter UV-Licht ausgewertet. Die korrekten Banden wurden ausgeschnitten, gereinigt und mittels NEBuilder fusioniert. Das Produkt wurde im Anschluss in kompetente *E. coli* (HB101) transformiert.

Von diesen Platten wurden 12 Klone gepickt, Plasmid DNA angefertigt und diese im Rahmen einer Test-PCR auf ihre Richtigkeit geprüft. Alle getesteten Klone zeigten eine Bande bei rund 400 bp, welche mit den verwendeten Primern (wiederum PRS 397 & PRS 398) spezifisch für das eingesetzte Insert M1 ist. Der erste Schritt in Richtung Gesamtklon war erfolgreich und das neugewonnene Plasmid wurde pAX1 benannt.

Vordere Hälfte, M2 (pAX2)

Das nächste zu klonierende PCR Fragment war die Sequenz 1 – 9.335 bp. Als Primer für dieses Insert (M2), fanden PRS 397 (1 forward) und PRS 401 (9.335 revers), sowie PRS 419 (9.317 forward + Vektor) / PRS 396 (25 revers +Vektor) für das Vektorplasmid (Proteus) Verwendung.

Die PCR Produkte wurden durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, gereinigt, in der HIFI NEBuilder Reaktion eingesetzt und transformiert.

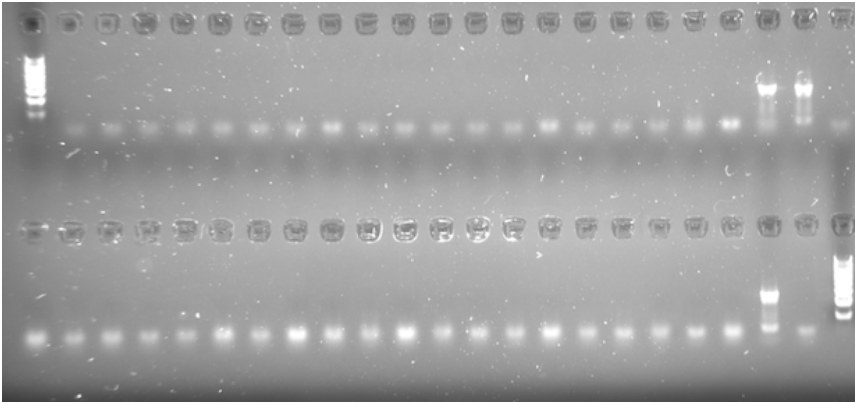


Abbildung 5 Agarosegelelektrophorese TEST-PCR von pAX2 Kolonien

erwartete Größe: 1380 bp

Geteiltes Agarosegel, obere Reihe Spuren 1 – 23, untere Reihe Spuren 24 – 46.

Nur der Klon in Spur 21 ist korrekt. Spuren 1 -und 46: Größenstandard 0,5 – 10kB; Spuren 22 und:44 Positivkontrolle; Spuren 23: und 45 Negativkontrolle.

Von den auf der Selektionsplatte entstandenen Kolonie wurden 44 mit einer Test PCR (PRS 167(2.900 forward) / PRS 184(4.280 revers)) überprüft. Lediglich 1 Kolonie zeigte eine positives PCR Ergebnis. Von diesen wurde unmittelbar eine Kultur angelegt und die Plasmid DNA präpariert. Durch einen Testverdau mit dem Restriktionsenzym BamH1 wurde das Plasmid pAX2 # 21 weiter charakterisiert. Die erwarteten Größen der Fragmente des BamH1-Verdaus betragen 2559 und 8911 Basenpaaren.

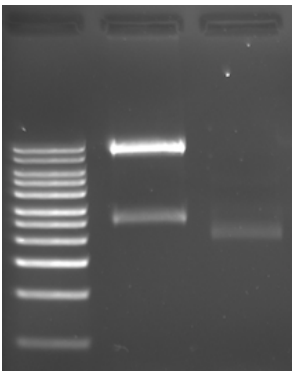


Abbildung 6 Agarosegelelektrophorese TESTVERDAU pAX2

Spur 1: Größenstandard; Spur 2: pAX2#21 +; Spur 3: pAX2#5 –

Aufbau des Gesamtklons pAX3

Nach Sequenzierung der 5' und 3' Enden und Bestätigung der Integrität von pAX2 wurde im nächsten Schritt die Gesamtkopie des Genoms von AUT 14-440 vervollständigt. Dazu fehlten noch der Sequenzabschnitt 9.336 - 15.019. Das entsprechende Fragment (M3) wurde durch PCR auf der bereits bestehend cDNA mit den Primern PRS 430 (9.336 forward) und PRS 431 (15.019 revers) erzeugt. Als Vektor diente pAX2#21 für die long distance PCR mit den Primern PRS 434 (15.005 forward) / PRS 401 (9.335 revers)

Die Produkte dieser beiden Reaktionen wurden nach der Gelelektrophorese gereinigt, jeweils 100 ng in der HIFI NEBuilder Reaktion eingesetzt und in Bakterien transformiert.

Von den entstandenen Kolonien auf der Selektionsagarplatte wurden 12 Klone angeimpft, Plasmid DNA präpariert und mit EcoR1 geschnitten. In der Sequenz sollten zwei EcoR1 Schnittstellen vorliegen, die bei vollständigen Plasmidklonen Fragmentlängen von 4357, 5819 und 6940 bp erzeugen.

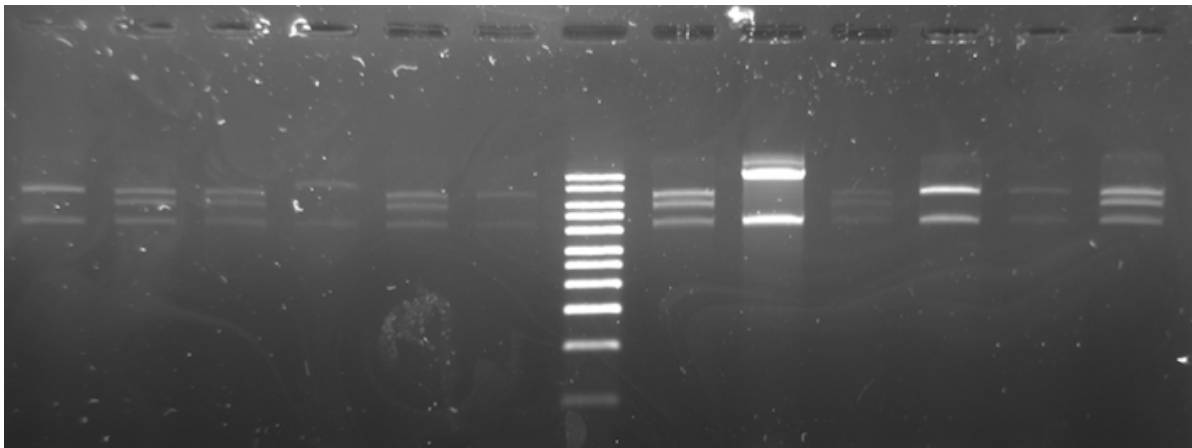


Abbildung 7 Agarosegelelektrophorese TESTVERDAU pAX3

Spuren 1-6: Minis 1-6; Spur 7: Größenstandard; Spuren 8-13: Minis 7-12

Insgesamt ergaben sechs der getesteten zwölf pAX3 Klone das erwartete Fragmentlängenmuster, (pAX3 #2, #3, #5, #7, #9, #12). Die Klonierung war erfolgreich und zeigt die hohe Effizienz der HIFI NEBuilder Methode. Auf eine vollständige Sequenzierung wurde verzichtet, da der cDNA Klon pAX3 funktionell getestet werden sollte.

Herstellung des viralen Genoms und funktionelle Charakterisierung

Um die Funktion der genomischen cDNA Kopie der PRRSV Aut14-440 zu testen, muss eine RNA Kopie angefertigt werden, die dem viralen Genom vollständig entspricht. Diese Kopie wird durch RNA Polymerasen erzeugt, ausgehend von einer passenden Promotorsequenz unmittelbar vor dem 5' Ende der genomischen RNA. In unserem Fall trug das Plasmid eine SP6 Promotorsequenz. Als Templates für die SP6 Transkription dienten die Klone pAX3 (#2, #7, #12, von denen eine long distance PCR mit den Primern PRS 202 (SP6-Promoter forward) und PRS 431 (15.019 revers) durchgeführt wurde. Gegenüber der klassischen Methode der Templateherstellung durch Linearisierung des Plasmids mit einem singulären Restriktionsenzym (AclI) hat die PCR den Vorteil der vollständigen Freiheit von RNasen. Spuren von RNase A sind bei der Plasmidreinigung nicht zu vermeiden und können das neu transkribierte RNA Molekül abbauen. Für die Transkription ist weiters wichtig, dass das PRRSV Genom ein 5' 7methyl G-G Cap enthält. Die Cap Struktur ist entscheidend für die RNA Stabilität und die Erkennung durch Translationsinitiationskomplexe. Um die CAP Struktur zu erzeugen, wird das Dinukleotid m7G-GTP im Überschuss zur Transkriptionsreaktion zugegeben, während die Konzentration GTP auf 20% reduziert wird. Auf diese Weise erhält man überwiegend 5' Cap haltige RNA Transkripte. Die erfolgreiche Synthese von cRNA wurde wiederum durch ein Agarosegel überprüft, wobei die einzelsträngige RNA sich mehr als doppelt so schnell auftrennt wie doppelsträngige DNA.

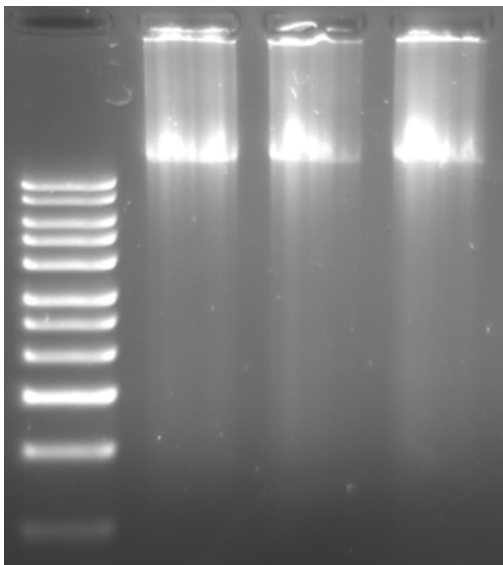


Abbildung 8 Agarosegelelektrophorese FULL-LENGTH-PCR AUT 14-440

Spur 1: Größenstandard; Spuren 2-4: Gesamtgenom AUT-440/14 geschrieben auf pAX3 (#2, #7, #12)

Der Erfolg der Transkription wurde mittels Gelelektrophorese unter UV-Licht überprüft.

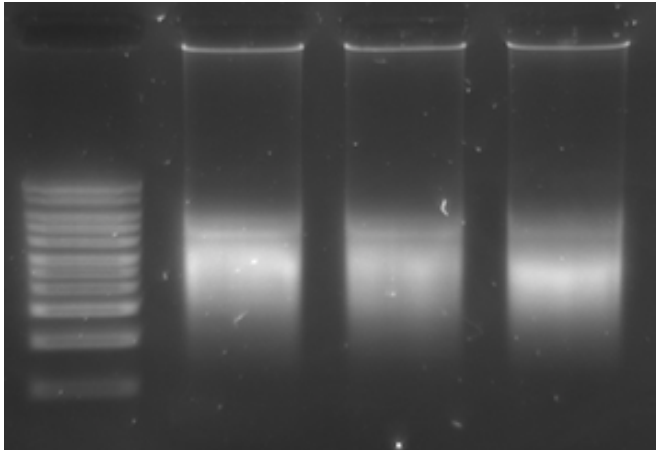


Abbildung 9 Agarosegelelektrophorese TRANSKRIPTION pAX3

Spur 1: Größenstandard; Spuren 2-4: Transkriptionsprodukte pAX3 (#2, #7, #12)

Elektroporation und Transfektion

Die meisten positiv Strang RNA Viren haben ein infektiöses Genom, d.h. das ausgehend von nackter RNA die Virusreplikation gestartet werden kann, wenn sie ins Zytoplasma gelangt. Um die aufgrund ihrer Länge hochgradig instabilen RNA Moleküle in Zellen zu verbringen wird das Verfahren der Elektroporation verwendet, dass mit Hilfe kurzer Stromimpulse die Plasmamembran für RNA durchlässig macht. Hierzu wurden 2×10^6 SK6 Zellen wurden durch Trypsinbehandlung abgelöst, gewaschen und mit dem SP6 Transkript gemischt. Die Elektroporation erfolgte durch einen Impuls von 180V, 950 μ Fd in einer Elektroporationsküvette mit 2mm Spalt.

Zwei Tage nach der Elektroporation wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert, permeabilisiert und mit dem Cy5 konjugiertem monoklonalen Antikörper N6 gegen das N-Protein inkubiert. Nur in Zellen, in denen Virusreplikation stattfindet, ist N - Protein nachweisbar. Die Expression von N-Protein wurde fluoreszenzmikroskopisch beurteilt. Cy5 zeigt eine Emission im roten Spektralbereich und spezifisch markierte Zellen sind ein Indikator für stattgefundene Virusreplikation. 48 Stunden nach der Elektroporation konnten eindeutig einzelne Zellen identifiziert werden, die N-Protein exprimierten. Nicht nur die Färbung, sondern auch die Verteilung des Antigens im Zytoplasma (und nicht im Kern) bedeuten die

Spezifität. Dass sich das Virus nicht weiter ausgebreitet hat ist dadurch zu erklären, dass PRRSV RNA zwar in Schweinenierenzellen (SK6) replizieren kann und auch Virus bildet, diese Zellen aber nur sehr ineffektiv infiziert. Die Bildung von infektiösem Virus als Beweis der vollständigen Funktionalität des synthetischen Virusgenoms wurde durch Infektion von empfänglichen porzinen Alveolarmakrophagen erbracht. Hier breitete sich das Virus sehr gut aus und führte innerhalb von 3 Tagen zur Zellyse.

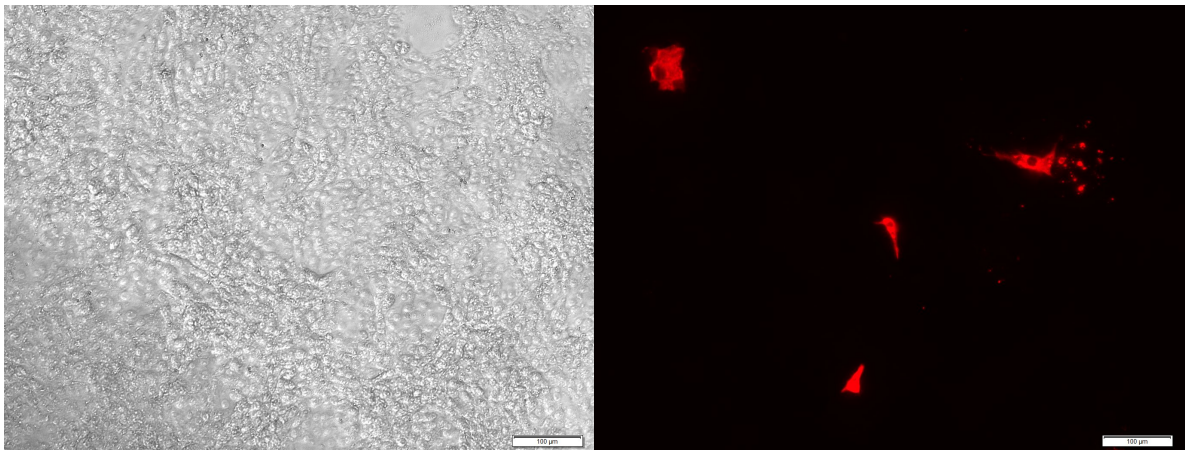


Abbildung 10 Nachweis der Replikation von pAX3 in SK6 Zellen durch Fluoreszenzmikroskopie
100-fache Vergrößerung: Links Hellfeld, rechts Cy5 Kanal. Einzelne Zellen weisen eine deutliche, zytoplasmatische Fluoreszenz nach Inkubation mit dem Cy5 markierten Anti N-Protein Antikörper auf.

Diskussion

Das Ziel der Arbeit war die Konstruktion eines molekularen cDNA Klons des PRRSV Feldisolats Aut14-440. Aut14-440 wurde ausgewählt, weil dieses Feldisolat zum einen aus einem klinisch auffälligen Ausbruch mit reproduktiven Symptomen in einem Ferkelerzeugerbetrieb stammt, zum anderen auch in einem Infektionsversuch bei Läuerschweinen respiratorische Symptome hervorrief (Sinn et al. 2016b). Dieses als mäßig virulent zu bezeichnende Isolat zeigte darüber hinaus eine genotypische Besonderheit, da im Überlappungsbereich von ORF3 und ORF4 eine ungewöhnliche Deletion von 12 Codons gefunden wurde (eingerahmter Bereich in Abb. 11).

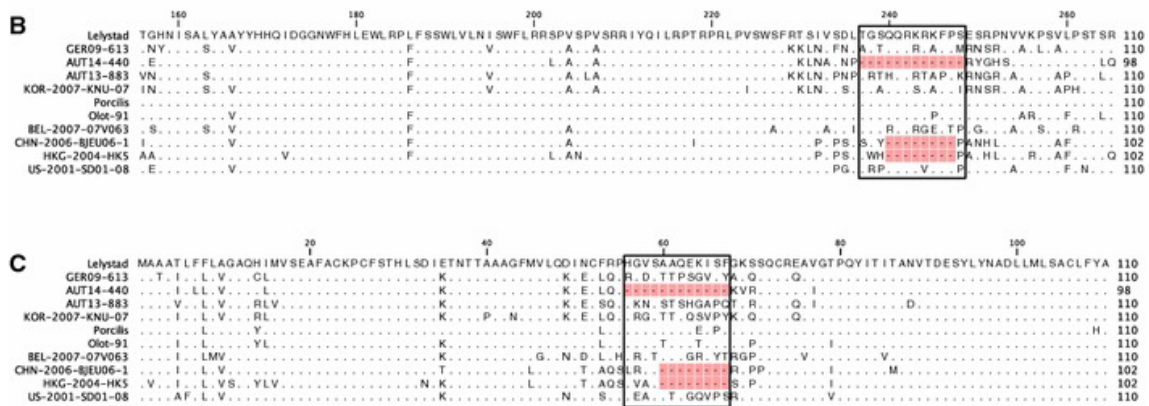


Abbildung 11 Partielle Aminosäuresequenzen von 11 verschiedenen europäischen PRRSV-Stämmen (GP3 und GP4)

Quelle: (Sinn et al. 2016a)

Da die Rezeptorbindung durch das Heterotrimer GP2, GP3 und GP4 vermittelt wird, ist zu erwarten, dass diese Deletion einerseits die Bindung an die Zelle beeinflusst, zum anderen die Bindung von spezifischen Antikörpern (z.B. von der Impfung stammend) verhindert. Ob jedoch ein Neutralisationsepitop in diesen Bereichen liegt, ist bislang unbekannt. Eine phänotypische Besonderheit von Aut14-440 ist die Fähigkeit, ohne vorherige Adaptation spontan die von der Grünen Meerkatze stammende Zelllinie MARC 145 Zellen zu infizieren. Normalerweise vermehren sich PRRSV1-Feldisolate nur auf porzinen Alveolarmakrophagen (PAMs), Ob allein das Fehlen der 12 Aminosäuren das erweiterte Wirtsspektrum (Sinn et al. 2016a) zur Folge hat, ist hypothetisch, kann aber in der Zukunft mit dem neu geschaffenen infektiösen Klon adressiert werden.

Eine solche Fragestellung lässt sich nur mit Hilfe reverser Genetik beantworten, indem in einer klonierten Kopie des Virusgenoms Veränderungen vorgenommen und anschließend die Eigenschaften des veränderten Virus analysiert werden. Voraussetzung hierfür ist aber zunächst die Herstellung einer solchen „infektiösen“ cDNA Kopie. Die größte Herausforderung ist dabei der Erhalt einer funktionellen cDNA Kopie, denn häufig werden durch die Reverse Transkriptase, PCR Amplifikationen und auch bei der Vermehrung der erhaltenen Plasmide in Bakterien Mutationen eingefügt. Im Falle des PRRSV Genomes handelt es sich um eine mehr als 15.000 nt lange einzelsträngige RNA, die nach Transfektion in die Zelle die Replikation initiiert. Dieser Vorgang ist gegenüber einer Infektion nicht besonders effektiv, da physiologisch niemals „nackte“ RNA vorliegt, so wie sie synthetisch erzeugt wird. Daher ist die Voraussetzung für die erfolgreiche Replikation, dass alle Genprodukte und cis aktiven RNA Elemente korrekt vorliegen. Fast jedes zusätzliche oder fehlende Nukleotid ist daher von entscheidender Bedeutung. Bei den in der Vergangenheit notwendigen zahlreichen Klonierungsschritten, zu denen oft Restriktionsenzymstellen eingeführt werden mussten, um Genomfragmente zusammensetzen, gelangten häufig Fehler in die Sequenz, so dass die Erzeugung des Gesamtklons oft viele Monate in Anspruch nehmen konnte oder am Ende ergebnislos aufgegeben wurde. Die Verfügbarkeit von „high fidelity“ thermostabilen DNA Polymerasen mit der Möglichkeit zur Synthese sehr langer Fragmente (20kB) sowie die Fusion von überlappenden doppelsträngigen Fragmente durch das sog. „Gibson assembly“ sind daher als Durchbruch zu bezeichnen. Dadurch ist es jetzt auch möglich geworden in wenigen Monaten einen funktionellen Gesamtklon von PRRSV Isolaten zu erzeugen.

Der wichtigste Schritt ist die Erzeugung einer möglichst vollständigen cDNA mit einer leistungsfähigen reversen Transkriptase, die als Template für die Amplifikation von langen Fragmenten verwendet werden kann. Das hat bei der Konstruktion von Aut14-440 für die Fragmente von 500 – 15.000 bp sehr effektiv funktioniert. Lediglich das 5' Ende konnte nicht ermittelt werden und musste mit Hilfe der 5' RACE (rapid amplification close to end) nach „tailing“ des 5' Endes mit Terminaler Transferase bestimmt werden. Die langen PCR Fragmente wurden mit einer modifizierten „*Pyrococcus furiosus*“ (Pfu) Polymerase (Phanta) erzielt. Selbst Fragmente von 18kb stellten für die Amplifikation kein Problem dar, wobei sich Extensionszeiten von 30 Sekunden pro KB als ausreichend erwiesen. Die Verwendung des HiFi NEB Builder Kits zum Zusammenbau der Plasmidkonstrukte erfolgte nach Herstellerangaben

und war außerordentlich effektiv. In der Regel mussten selten mehr als 12 Plasmidkolonien auf der Transformationsplatte analysiert werden um die korrekten Klonierungsprodukte zu identifizieren.

Mit den im Labor bereits entwickelten Verfahren erfolgte die Konstruktion von pAX3 in drei Schritten. Nach Ermittlung des 5' Endes wurde ein Forward-Primer (PRS 397) entworfen, der zusammen mit dem Reverse-Primer (PRS 401) ein 9,3kb großes PCR Fragment amplifizieren konnte. Dieses Fragment wurde in das Minimalplasmid „Proteus“ durch überlappende Primer in den mit komplementären Primern amplifizierten Plasmidvektor eingesetzt (pAX2). Im nächsten Schritt wurde dann der durch Restriktion und Sequenzierung validierte pAX2 durch das ca. 6kb lange 3' Fragment ergänzt. Die Optimierung der „langen“ PCR Reaktionen bedurfte einiger Wiederholungen. Ein kritischer Schritt war jedoch die Aufreinigung der langen PCR Produkte aus dem Agarosegel. Für die Klonierung war es notwendig, die PCR Produkte zu reinigen, d.h. von kürzeren PCR Produkten zu befreien. Die gängigen Gel Extraktion Kits sind für DNA Fragmente von maximal 10kb ausgelegt. Daher war die Effizienz der Reinigung gering und es konnten oft nur weniger als 20 % der Ausgangsmenge von der Säulenmatrix eluiert werden. Die Erhöhung der Temperatur bei der Elution mit H₂O erwies sich als hilfreich. Die Transkription des synthetischem Aut14-440 Genoms nach Linearisierung des Plasmids am 3' Ende mit SP6 Polymerase ist ein Standardprotokoll, jedoch ist es notwendig m⁷G-GTP als CAP Analog in die Transkriptionsreaktion zu geben. Um den bestmöglichen Einbau in die Transkripte zu erzielen, muss die Konzentration von GTP um den Faktor 5 reduziert werden. Dies führt jedoch zu einer Reduktion der vollständig synthetisierten Transkripte, da GTP in den Unterschuss gerät. Aus diesem Grunde wurde nach 30min Reaktionszeit GTP in einer Endkonzentration von 1mM zugegeben. Die erzeugte RNA wurde in SK6 Zellen elektroporiert; diese Zellen sind zwar für PRRSV nicht empfänglich, nach Transfektion repliziert aber die RNA und infektiöses Virus wird produziert. Mit dem Nachweis der Replikation in SK6 Zellen und der erfolgreichen Überinfektion von porzinen Alveolarmakrophagen (PAMs) im Anschluss an diese Arbeit war die gestellte Aufgabe erfüllt.

Eine andere Möglichkeit der Konstruktion wäre die Bestellung vollständig synthetischer DNA, die bei kommerziellen Herstellern in Auftrag gegeben werden kann. Hierbei ist keine Klonierung notwendig, jedoch wird bei diesem Verfahren vorausgesetzt, dass eine validierte Nukleotidsequenz vorliegt. Zudem ist das Verfahren viel kostspieliger. In unserem Fall lag zwar eine Gesamtsequenz vor (mit Ausnahme des 5' Endes), die PCR Klonierung der genomischen RNA erlaubt aber die Erfassung der in der Natur üblichen Quasispezies, d.h. es gibt in der Population immer mehr als eine einzige Sequenz

Die Herstellung funktioneller molekularer Klone von PRRSV Isolaten ist eine Voraussetzung für das Verständnis der Virusbiologie. Neben der biologischen Untersuchung eines Virus mit einem genau definierten Genom, besteht die Möglichkeit, das klonierte Genom zu manipulieren und reverse Genetik anzugehen. Bei der reversen Genetik wird versucht, durch die induzierte Veränderung bestimmter Merkmale eines Organismus Aussagen über dessen genetisches Potenzial zu treffen. Bezogen auf PRRSV können die funktionellen cDNA Klone helfen, die Mechanismen der Virulenz, der Persistenz, der Immunevasion und der Epidemiologie weiter aufzuklären (Pileri und Mateu 2016).

Zusammenfassung

Das Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, kurz PRRSV, gehört zur Familie der Arteriviridae, liegt einzelsträngig sowie in positiver Polarität vor. Es ist der Verursacher einer der wichtigsten Erkrankungen in der Schweinemedizin, welche jedes Jahr hohe wirtschaftliche Verluste verursacht.

Die Verfügbarkeit infektiöser cDNA-Klone bietet die Möglichkeit zur Analyse, und Modifizierung viraler Genome auf molekularer Ebene und hat die Erforschung der Virusreplikation, Pathogenese und der Entwicklung von neuen Impfstoffen stark unterstützt. Das Ziel dieser Arbeit war es, einen molekularen cDNA-Klon des Feldisolates Aut 14-440 zu konstruieren, da dieser Besonderheiten im Genom sowie in der von ihm ausgelöster Klinik aufweist.

Anders als bei früheren Versuchsansätzen, bei denen durch zahlreiche Klonierungsschritte häufig Fehler in die Sequenz gelangen konnten, wurde durch die Kombination von neuen, leistungsfähigen Enzymen für die PCR und der „Gibson assembly“ Technologie ein höherer Grad an Sequenzstabilität bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen erreicht. Die wichtigsten Klonierungsschritte waren die Ermittlung des korrekten 5' Endes, die Ermittlung des korrekten 3' Endes und die Klonierung möglichst langer zusammenhängender cDNA Fragmente.

Der finale Klon, pAX3, wurde in empfängliche Zellen mittels Elektroporation eingebracht und nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurden diese Zellen fixiert, permeabilisiert und mit einem Cy5 konjugiertem Antikörper gegen das N-Protein inkubiert. Ohne Virusreplikation in der Zelle wäre auch kein N-Protein nachweisbar. Das bedeutet im Umkehrschluss, dass eine im Fluoreszenzmikroskop erkennbare rote Färbung einzelner Zellen ein guter Hinweis auf stattgefundene Virusreplikation ist. Dies war, zusammen mit der Verteilung des Antigens im Zytoplasma, ein Beweis dafür, dass pAX3 replikationsfähig ist.

Summary

The Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, PRRSV for short, belongs to the family Arteriviridae, is single-stranded and has a positive polarity. It is the cause of one of the most important diseases in pig medicine, which causes high economic losses every year.

The availability of infectious cDNA clones provides the potential for analysis and modification of viral genomes at the molecular level and has strongly supported the study of virus replication, pathogenesis, and the development of new vaccines. The aim of this work was to construct a molecular cDNA clone of the field isolate Aut 14-440, as it exhibits peculiarities in the genome as well as in the clinical symptoms that it triggered.

Unlike previous approaches, where multiple cloning steps often allowed for errors in the sequence, the combination of new, high-performance enzymes for PCR and the Gibson assembly technology resulted in a higher level of sequence stability in the experiments performed in this work. The most important cloning steps were the determination of the correct 5' end, the determination of the correct 3' end and the cloning of contiguous cDNA fragments as long as possible.

The final clone, pAX3, was electroporated into susceptible cells and after 48 hours of incubation, these cells were fixed, permeabilized and incubated with a Cy5-conjugated antibody against the N-protein. Without virus replication in the cell, no N-protein would be detectable. This implies, conversely, that a red staining of individual cells recognizable in the fluorescence microscope is a good indication of the virus replication that has taken place. This, together with the distribution of the antigen in the cytoplasm, proved that pAX3 is replicable.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------|---------------------------------------|
| Ak | Antikörper |
| bp | Basenpaare |
| C | Cytosin |
| cDNA | Complementary DNA |
| CD163 | Cluster of Differentiation 163 |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| EAV | Equines Arteritis Virus |
| E. coli | Escherichia coli |
| E-Protein | Envelope-Protein |
| GP | Glykoprotein |
| G | Guanidin |
| kb | Kilobasenpaare |
| kD | Kilodalton |
| LDV | Lactate-Dehydrogenase-Elevating Virus |
| MARC | Meat Animal Research Center |
| MCS | Multiple Cloning Sites |
| MOI | Multiplicity of Infection |
| M-Protein | Membran Protein |
| mRNA | Messenger RNA |
| N-Protein | Nukleokapsidprotein |
| NSP | Nichtstrukturprotein |
| ORF | Open Reading Frame |

| | |
|-------|--|
| PAM | Porzine Alveolarmakrophagen |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| PCV-2 | Porzines Circovirus Typ 2 |
| PFA | Paraformaldehyd |
| pp | Polyprotein |
| PRRSV | Porcine-Reproductive-and-Respiratory-Syndrom-Virus |
| rNTP | Ribonucleosid-Triphosphat |
| rpm | Revolutions per Minute |
| RACE | rapid amplification of cDNA-ends |
| SK6 | Swine Kidney |
| SHFV | Simian-Haemorrhagic-Fever-Virus |
| UTR | Untranslated Region |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1 Genomaufbau PRRSV | 2 |
| Abbildung 2 Agarosegelelektrophorese: Bestimmung 5'-Ende..... | 25 |
| Abbildung 3 Agarosegelelektrophorese..... | 26 |
| Abbildung 4 Schema Klonierungsschritte | 27 |
| Abbildung 5 Agarosegelelektrophorese TEST-PCR von pAX2 Kolonien..... | 29 |
| Abbildung 6 Agarosegelelektrophorese TESTVERDAU pAX2 | 29 |
| Abbildung 7 Agarosegelelektrophorese TESTVERDAU pAX3 | 30 |
| Abbildung 8 Agarosegelelektrophorese FULL-LENGTH-PCR AUT 14-440 | 31 |
| Abbildung 9 Agarosegelelektrophorese TRANSKRIPTION pAX3..... | 32 |
| Abbildung 10 Nachweis der Replikation von pAX3 in SK6 Zellen durch Fluoreszenzmikroskopie | 33 |
| Abbildung 11 Partielle Aminosäuresequenzen von 11 verschiedenen europäischen PRRSV- Stämmen (GP3 und GP4)..... | 34 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1 Liste der verwendeten Primer..... | 11 |
| Tabelle 2 Einstellung des Thermocyclers..... | 13 |

Literaturverzeichnis

- Birnboim HC, Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research*, 7(6):1513–23.
- Bordet E, Frétaud M, Crisci E, Bouguyon E, Rault S, Pezant J, Pleau A, Renson P, Giuffra E, Larcher T, et al. 2019. Macrophage-B Cell Interactions in the Inverted Porcine Lymph Node and Their Response to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Frontiers in immunology*, 10:953.
- Chareerntantanakul W. 2012. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines: Immunogenicity, efficacy and safety aspects. *World journal of virology*, 1(1):23–30.
- Chen Y, Guo R, He S, Zhang X, Xia X, Sun H. 2014. Additive inhibition of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection with the soluble sialoadhesin and CD163 receptors. *Virus Research*, 179:85–92.
- Clark DP, Pazdernik NJ. 2009. DNA-Rekombinationstechnologie. *Molekulare Biotechnologie: Grundlagen und Anwendungen*. 55–85, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag;
- Dietze K, Pinto J, Wainwright S, Hamilton C. 2011. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): virulence jumps and persistent circulation in Southeast Asia. *Focus on*, (5):8.
- Fan P, Wei Y, Guo L, Wu H, Huang L, Liu J, Liu C. 2013. Synergistic effects of sequential infection with highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2.
- Fang Y, Rowland RRR, Roof M, Lunney JK, Christopher-Hennings J, Nelson EA. 2006. A full-length cDNA infectious clone of North American type 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus: expression of green fluorescent protein in the Nsp2 region. *Journal of virology*, 80(23):11447–55.
- Fang Y, Treffers EE, Li Y, Tas A, Sun Z, van der Meer Y, de Ru AH, van Veelen PA, Atkins JF, Snijder EJ, et al. 2012. Efficient -2 frameshifting by mammalian ribosomes to synthesize an additional arterivirus protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(43):E2920-8.

- Gstraunthaler G, Lindl T. 2013. Subkultivierung/ Passagieren. Zell- und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen. 113–119, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg;
- Haiwick G, Hermann J, Roof M, Fergen B, Philips R, Patterson A. 2018. Examination of viraemia and clinical signs after challenge with a heterologous PRRSV strain in PRRS Type 2 MLV vaccinated pigs: A challenge-dose study. *PloS one*, 13(12):e0209784.
- J Wissink EH, Kroese M V, R van Wijk HA, M Rijsewijk FA, M Meulenberg JJ, M Rottier PJ. 2005. Envelope Protein Requirements for the Assembly of Infectious Virions of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Virions of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) contain six membrane proteins: the major proteins GP 5 and M and the minor proteins GP 2a , E, GP 3 , and GP 4. Here, we studied the envelope protein requirements for PRRSV particle formation and infectivity using full-length cDNA clones in which the Downloaded from. *JOURNAL OF VIROLOGY*, 79(19):12495–12506.
- Kuhn JH, Lauck M, Bailey AL, Shchetinin AM, Vishnevskaya T V., Bào Y, Ng TFF, LeBreton M, Schneider BS, Gillis A, et al. 2016. Reorganization and expansion of the nidoviral family Arteriviridae. *Archives of Virology*, 161(3):755–768.
- Ladinig A, Detmer SE, Clarke K, Ashley C, Rowland RRR, Lunney JK, Harding JCS. 2015. Pathogenicity of three type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains in experimentally inoculated pregnant gilts. *Virus Research*, 203:24–35.
- Li H, Zhou E-M, Liu C-Q, Yi J-Z. 2015. Function of CD163 fragments in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *International journal of clinical and experimental medicine*, 8(9):15373–82.
- Li Y, Tas A, Snijder EJ, Fang Y. 2012. Identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus ORF1a-encoded non-structural proteins in virus-infected cells. *Journal of General Virology*, 93(Pt_4):829–839.
- Li Y, Shang P, Shyu D, Carrillo C, Naraghi-Arani P, Jaing CJ, Renukaradhya GJ, Firth AE, Snijder EJ, Fang Y. 2018. Nonstructural proteins nsp2TF and nsp2N of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) play important roles in suppressing host innate immune responses. *Virology*, 517:164–176.
- Malgarin CM, Nosach R, Novakovic P, Suleman M, Ladinig A, Detmer SE, MacPhee DJ,

- Harding JCS. 2019. Classification of fetal resilience to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) based on temporal viral load in late gestation maternal tissues and fetuses. *Virus Research*, 260:151–162.
- Meulenberg JJ, Bos-de Ruijter JN, van de Graaf R, Wensvoort G, Moormann RJ. 1998. Infectious transcripts from cloned genome-length cDNA of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of virology*, 72(1):380–7.
- Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H. 2010. Arteriviruses. *Molekulare Virologie*. 239–246, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag;
- Montaner-Tarbes S, Del Portillo HA, Montoya M, Fraile L. 2019. Key Gaps in the Knowledge of the Porcine Respiratory Reproductive Syndrome Virus (PRRSV). *Frontiers in veterinary science*, 6:38.
- Mülhardt C. 2013. *Der Experimentator Molekularbiologie Genomics*. 7. Auflage 7. Auflage. Heidelberg: Springer Spektrum.
- Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH. 1982. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields.
- Nielsen HS, Liu G, Nielsen J, Oleksiewicz MB, Bøtner A, Storgaard T, Faaberg KS. 2003. Generation of an infectious clone of VR-2332, a highly virulent North American-type isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of virology*, 77(6):3702–11.
- Pileri E, Mateu E. 2016. Review on the transmission porcine reproductive and respiratory syndrome virus between pigs and farms and impact on vaccination. *Veterinary Research*, 47(1):108.
- Pitkin A, Deen J, Dee S. 2009. Further assessment of fomites and personnel as vehicles for the mechanical transport and transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire*, 73(4):298–302.
- Renukaradhya G, Binjawadagi B, Dwivedi V, Manickam C, Ouyang K, Torrelles J. 2014. An innovative approach to induce cross-protective immunity against porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the lungs of pigs through adjuvanted nanotechnology-based vaccination. *International Journal of Nanomedicine*, 9(1):1519.
- Schulze M, Revilla-Fernández S, Schmoll F, Grossfeld R, Griessler A. 2013. Effects on boar

- semen quality after infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a case report.
- Senthilkumar D, Rajukumar K, Sen A, Kumar M, Shrivastava D, Kalaiyarasu S, Gautam S, Singh F, Kulkarni DD, Singh VP. 2018. Pathogenic characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus of Indian origin in experimentally infected piglets. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(6):1522–1536.
- Sinn L, Jansko B, Lamp B, Zieglowski L, Riedel C, Koinig H, Mößlacher G, Hennig-Pauka I, Rümenapf T. 2016a. Characterization of two Austrian porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) field isolates reveals relationship to East Asian strains. *Veterinary Research*, 47(1):17.
- Sinn LJ, Klingler E, Lamp B, Brunthaler R, Weissenböck H, Rümenapf T, Ladinig A. 2016b. Emergence of a virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) 1 strain in Lower Austria.
- Snijder EJ, Kikkert M. 2013. Arteriviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Hrsg. *Fields virology*. 859–879, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins;
- Sun Y, Li D, Giri S, Prasanth SG, Yoo D. 2014. Differential host cell gene expression and regulation of cell cycle progression by nonstructural protein 11 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *BioMed research international*, 2014:430508.
- Sur JH, Doster AR, Christian JS, Galeota JA, Wills RW, Zimmerman JJ, Osorio FA. 1997. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replicates in testicular germ cells, alters spermatogenesis, and induces germ cell death by apoptosis. *Journal of virology*, 71(12):9170–9.
- Thaa B, Sinhadri BC, Tievesch C, Krause E, Veit M. 2013. Signal Peptide Cleavage from GP5 of PRRSV: A Minor Fraction of Molecules Retains the Decoy Epitope, a Presumed Molecular Cause for Viral Persistence. *PLoS ONE*, 8(6):e65548.
- Tian D, Wei Z, Zevenhoven-Dobbe JC, Liu R, Tong G, Snijder EJ, Yuan S. 2012. Arterivirus minor envelope proteins are a major determinant of viral tropism in cell culture. *Journal of virology*, 86(7):3701–12.
- Wang T-Y, Fang Q-Q, Cong F, Liu Y-G, Wang H-M, Zhang H-L, Tian Z-J, Tang Y-D, Cai X-H. 2019. The Nsp12-coding region of type 2 PRRSV is required for viral subgenomic mRNA synthesis.

- Wang T, Wang X, Li X-A, Nie L, Zhang M, Liu S, Zhao X, Shang Y, Zhou E-M, Hiscox JA, et al. 2015. Intranasal inoculation of sows with highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus at mid-gestation causes transplacental infection of fetuses. *Veterinary research*, 46:142.
- Wensvoort G, Terpstra C, Pol JMA, ter Laak EA, Bloemraad M, de Kluyver EP, Kragten C, van Buiten L, den Besten A, Wagenaar F, et al. 1991. Mystery swine disease in the Netherlands: The isolation of Lelystad virus. *Veterinary Quarterly*, 13(3):121–130.
- Yang L, He J, Wang R, Zhang X, Lin S, Ma Z, Zhang Y. 2019. The nonstructural protein 11 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces STAT2 degradation to inhibit interferon signaling. *Journal of virology*, JVI.01352-19.