

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmittel

6 cm Schalen	TPP, Schweiz
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	Promega, Mannheim
Ammoniumperoxodisulfat	Sigma, Deisenhofen
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Annexin-V-FITC	Caltag, USA
Annexin-V-Fluos	Roche, Penzberg
Anti-Schaum	Sigma, Deisenhofen
Bradford-Reagenz	BioRad, München
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
BSA (bovines Serum Albumin)	Sigma, Deisenhofen
Butanol	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe
Capronsäure	Sigma, Deisendorf
Chloroform	Merck, Darmstadt
CitiFluor AF-1	Citifluor LTD., England
Coomassie brilliant blue R250	Fluka, Deisenhofen
DAPI (4'-6-Diamidino-2-phyindol)	Sigma, Deisenhofen
Deckgläschen	Roth, Karlsruhe
Didesoxynukleotide	Roche, Mannheim
Dimethylsulfoxid	Fluka, Deisenhofen
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, Deisenhofen
EB Puffer	Quiagen, Hilden
ECL-Western Blot Detektionssystem (Reagenz 1 & 2)	Amersham, Schweden
EDTA (Ethylendiaminotetraessigsäure)	Merck, Darmstadt
Einmalspritzen (10 ml)	Braun, Melsungen
Eosin Lösung	Merck, Darmstadt
Eppendorf-Cups	Eppendorf, Hamburg
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	RKI, Berlin
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Eukitt	O. Kindler, Freiburg
Formaldehyd	Fluka, Deisenhofen
Gel Blotting Papier	Schleicher & Schnell, Dassel
Glycerol	Sigma, Deisenhofen
Glycin	Serva, Heidelberg
Hämatoxylin Lösung	Sigam Diagnostics, USA
Hybond ECL Membran	Amersham, Schweden
Hybond-PVDF Membran	Amersham, Schweden
Hyperfilm (ECL & MP)	Amersham, Schweden
Hyperfilm (ECL)	Amersham, Schweden
Isoamylalkohol	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt

Material

Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Fluka, Deisendorf
Kanülen	B. Braun, Melsungen
Luciferin D(-)	Roche, Mannheim
Magermilchpulver	Fluka, Deisenhofen
2-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	ICN, USA
Natriumcarbonat	Fluka, Deisenhofen
Natriumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma, Deisenhofen
Natriumthiosulfat	Fluka, Deisenhofen
Natriumhydroxid Plätzchen	Merck, Darmstadt
Passive Lysis Buffer	Promega, USA
Pasteurpipetten	neoLab, Heidelberg
peqGOLD TriFast™-Reganz	PEQLAB Biotech., Erlangen
Phenol	Carl Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat)	Fluka, Deisenhofen
Ponceau S	Sigma, Deisenhofen
Reflotron Teststreifen	Roche, Mannheim
Roti®-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Fluka, Deisenhofen
Spritzen	B. Braun, Melsungen
Sterican Einmalkanülen	Braun, Melsungen
Sterilfilter	Schleicher & Schuell, Dassel
SuperSignal West-Dura Detection Reagent	Pierce, USA
TEMED	
(N,N,N',N'-tetramethylaminomethan)	Sigma, Deisenhofen
Trichloressigsäure	Riedel-de Haen, Seelze
Trishydroxymethylaminomethan	Merck, Darmstadt
Triton-X-100	Fluka, Deisenhofen
Tween-20	Roth, Karlsruhe
Whatman Filterpapier 3mm	Fischer, Hannover
Zellkulturflaschen T175cm ²	Nunc, Österreich
Zellkulturplatten (6 und 24 Lochplatten)	TPP, Schweiz
Zellkulturschalen 6 cm	TPP, Schweiz
Zellschaber	TPP, Schweiz
Zentrifugenröhrchen (15 ml / 50 ml)	TPP, Trasadingen

Die Chemikalien, Salze und Lösungsmittel wurden in der Qualität „reinst“ oder „analytic grade“ bezogen. Das verwendete Wasser entstammte einer Reinstwasseranlage der Firma MILLIPORE (Milli Q).

Material

3.1.2 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim
DNaseI	Roche, Mannheim
Herkulase DNA Polymerase	Stratagene, USA
Ligase	Roche, Mannheim
MMLV Reverse Transkriptase	BD Biosciences, USA
Restriktionsendonukleasen Typ II:	
<i>Hind</i> III	Roche, Mannheim
<i>Bam</i> HI	New England Biolabs, USA
RQ1 RNase-free DNase	Promega, USA
Taq DNA Polymerase	Qiagen, Hilden
Trypsin	PAA, Österreich

3.1.3 Antikörper

Tabelle 1: Primäre Antikörper

Primäre Antikörper	Aus Spezies	Verdünnung für Western Blot (IF*)	Verdünnt in	Hersteller
Anti V5 AK	Kaninchen	1:2000 IF 1:200	10% Milchpulver in PBS-T	Invitrogen, England
Antiserum NS5A	Kaninchen	1:1000 IF 1:200	10% Milchpulver in PBS-T	T.B.**
Anti Aktin	Maus	1:10000	5% Milchpulver in PBS-T	Sigma, Deisenhofen
Anti Raf-1	Maus	1:2000	10% Milchpulver in PBST	Transduction Lab., Kanada
Anti p-Raf-1 (Ser338)	Maus	1:1000	5% Milchpulver in TBS-T	Upstate, USA
Anti ERK2 (C-14)	Kaninchen	1:200	10% Milchpulver in PBS-T	Santa Cruz Biotech, USA
Anti active MAPK (α p-ERK)	Kaninchen	1:2000	PVDF-Puffer	Promega, USA
Anti MEK1 (H-8)	Maus	1:1000	10% Milchpulver in PBS-T	Santa Cruz Biotech, USA
Anti p-MEK1/2 (Ser217/221)	Kaninchen	1:2000	5% Milchpulver in TBS-T	Cell Signaling Techn., USA
Anti PARP (H-250)	Kaninchen	1:1000	10% Milchpulver in PBS-T	Santa Cruz Biotech, USA
Anti PCNA (PC10)	Maus	1:1000	10% Milchpulver in PBS-T	Santa Cruz Biotech, USA
Anti PKR	Kaninchen	1:800	10% Milchpulver in PBS	Cell Signaling Techn., USA
Anti 2',5'-OAS	Kaninchen	1:300	10% Milchpulver in PBS	AbGent, USA
Anti Tubulin	Kaninchen	1:1000	10% Milchpulver in PBS	Santa Cruz Biotech, USA

*IF: Verwendung bei Immunfluoreszenzen; **Das Antiserum wurde von Mitarbeitern der Forschungsgruppe generiert.

Material

Tabelle 2: Sekundäre Antikörper

Sekundäre Antikörper	Aus Spezies	Verdünnung für Western Blot / IF*	Verdünnt in	Hersteller
anti Maus Ig Peroxidase-konjugiert	Schaf	1:2000	10% Milchpulver in PBST	Amersham Pharmacia Biotech, Schweden
anti Kaninchen Ig Peroxidase-konjugiert	Esel	1:2000	10% Milchpulver in PBST	Amersham Pharmacia Biotech, Schweden
anti Kaninchen Ig FITC-konjugiert	Ziege	1:400*	10% BSA in PBST	Jackson Immuno-Research
anti Kaninchen Ig Cy3-konjugiert	Ziege	1:400*	10% BSA in PBST	Jackson Immuno-Research

*Verwendung bei Immunfluoreszenzen

3.1.4 Materialien für die Zellkultur

für Huh7 Zellen

DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium)
 FCS (fötales Kälberserum)
 Trypsin-Lösung
 Penicillin-Streptomycin-Lösung
 ExGen500
 L-Glutamin
 G418 (Neomycin)

Sigma, Deisenhofen
 PAA, Österreich
 PAA, Österreich
 PAA, Österreich
 Fermentas, USA
 PAA, Österreich
 PAA, Österreich

für Bakterienzellen

LB Medium
 Bactoagar

Eigene Herstellung
 Promega, Mannheim

3.1.5 Längenstandards

LMW-Marker
 Rainbow Marker RPN 755/756
 SeeBlue Plus2 Protein Marker
 DNA Längenstandard 1kb ladder

Amersham Pharmacia Biotech, Schweden
 Amersham Pharmacia Biotech, Schweden
 Invitrogen, England
 Boehringer, Mannheim

3.1.6 Zytokine und Inhibitoren

RNasin[®] Ribonuclease Inhibitor
 Killer Trail
 Tumornekrosefaktor α
 Etoposide
 Actinomycin D
 Cycloheximid
 Gö 6976
 PD 98059
 U0126
 Aprotinin
 Leupeptin
 PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid)

Promega, Madison, USA
 Alexis, Schweiz
 PeproTech, USA
 Sigma, Steinheim
 Sigma, Deisenhofen
 Sigma, Deisenhofen
 Merck/Calbiochem, Darmstadt
 Merck/Calbiochem, Darmstadt
 Merck/Calbiochem, Darmstadt
 Sigma, Deisenhofen
 PAA, Österreich
 PAA, Österreich

Material

3.1.7 Verwendete Kits und Arrays

QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
BD Atlas™ cDNA Expression Array (Atlas human Apoptose Array 7743-1)	BD Biosciences, USA

3.1.8 Plasmide

a) kommerziell erhältliche Plasmide

pEGFP-N1	Clontech, USA
pCMV-RasN17	Clontech, Kanada
pcDNA 3.1(-)	Invitrogen, England
pcDNA3.1/V5-His-Topo	Invitrogen, England
pRK5	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von: A. Ulrich, MPI, Martinsried

b) andere Plasmidkonstrukte

Tabelle 3: Plasmide und Vektoren

Expressionsprotein	Vektor	Resistenz	Expressions-system	Erläuterung	Verwendete Primerpaare
Raf C-4	pRK5	Ampicillin	huh7 Zellen	Regulatorischer Teil von Raf-1	*
NS5A (1-449)	pcDNA 3.1 (-)	Ampicillin	huh7 Zellen	Volle Länge NS5A-Protein	MK002/ MK003
NS5A (31-449)	pcDNA 3.1 (-)	Ampicillin	huh7 Zellen	NS5A N-terminale Deletionsmutante	MK004/ MK003
NS5A (105-449)	pcDNA 3.1 (-)	Ampicillin	huh7 Zellen	NS5A N-terminale Deletionsmutante	MK008/ MK003
NS5A (211-449)	pcDNA 3.1 (-)	Ampicillin	huh7 Zellen	NS5A N-terminale Deletionsmutante	MK009/ MK003
NS5A (302-449)	pcDNA 3.1 (-)	Ampicillin	huh7 Zellen	NS5A N-terminale Deletionsmutante	MK015/ MK003
NS5A (1-378)	pcDNA 3.1 (-)	Ampicillin	huh7 Zellen	NS5A C-terminale Deletionsmutante	MK002/MK007
NS5A (1-326)	pcDNA 3.1 (-)	Ampicillin	huh7 Zellen	NS5A C-terminale Deletionsmutante	MK002/MK006
NS5A (1-215)	pcDNA3.1/V5-His-Topo	Ampicillin	huh7 Zellen	NS5A C-terminale Deletionsmutante	MK002/MK005
NS5A (1-163)	pcDNA3.1/V5-His-Topo	Ampicillin	huh7 Zellen	NS5A C-terminale Deletionsmutante	MK002/MK014

* Das Plasmid pRK5-Raf-C4 wurde freundlicherweise von U. Rapp (Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt (Bruder et al., 1992).

Für alle NS5A-Konstrukte wurde die NS5A-Sequenz des Genotyps 1b des Hepatitis C Virus verwendet.

Material

3.1.9 Synthetische Oligonukleotide und Sequenziermix

Tabelle 4: Primer für PCR

Primer	Art & Länge [bp]	Sequenz
MK002	Vorwärtsprimer [42]	5'-gcgctcgacgcgggatccgtatgggctccggctcgtggcta-3'
MK003	Rückwärtsprimer [39]	5'-gcgtatctagaagcttcttcagcagcagacgatgctgc-3'
MK004	Vorwärtsprimer [42]	5'-gcgctcgacgcgggatccgtatgccgaaattgccgggagtc-3'
MK008	Vorwärtsprimer [42]	5'-gcgctcgacgcgggatccgtatgccgaactattccaggcg-3'
MK009	Vorwärtsprimer [42]	5'-gcgctcgacgcgggatccgtatgacagcagagacggctaaa-3'
MK015	Vorwärtsprimer [45]	5'-gcgctcgacgcgggatccgtatggcagagatcctgcgaaaatcc-3'
MK022	Vorwärtsprimer [20]	5'-gcagcagacgatgctcgc-3'
MK023	Rückwärtsprimer [20]	5'-gcagagatcctgcgaaaatc-3'
TB059	Vorwärtsprimer [23]	5'-cgtgctggtattgtgctgtctc-3'
TB060	Rückwärtsprimer [24]	5'-attggtgagcccacctggaatg-3'
TB061	Vorwärtsprimer [20]	5'-tcactgtgctgaactacc-3'
TB062	Rückwärtsprimer [20]	5'-ggaacatagccgtaaacgc-3'
humBAct f	Vorwärtsprimer [22]	5'-acacggcattgtaaccaactgg-3'
humBAct b	Rückwärtsprimer [22]	5'-ctcattccgatagtgatgacc-3'

Tabelle 5: Primer für die Sequenzanalyse

Primer	Art & Länge [bp]	Sequenz
MK002	Vorwärtsprimer [42]	5'-gcgctcgacgcgggatccgtatgggctccggctcgtggcta-3'
MK003	Rückwärtsprimer [39]	5'-gcgtatctagaagcttcttcagcagcagacgatgctgc-3'
MK004	Vorwärtsprimer [42]	5'-gcgctcgacgcgggatccgtatgccgaaattgccgggagtc-3'
MK006	Rückwärtsprimer [39]	5'-gcgtatctagaagcttctttatggagggtgtaatccgg-3'
MK007	Rückwärtsprimer [39]	5'-gcgtatctagaagcttctttaagccagctccgccaaggc-3'
MK008	Vorwärtsprimer [42]	5'-gcgctcgacgcgggatccgtatgccgaactattccaggcg-3'
MK009	Vorwärtsprimer [42]	5'-gcgctcgacgcgggatccgtatgacagcagagacggctaaa-3'
MK015	Vorwärtsprimer [45]	5'-gcgctcgacgcgggatccgtatggcagagatcctgcgaaaatcc-3'
MK016	Rückwärtsprimer [36]	5'-gcgctctagaagcctctgtacctgtgcaaccgcac-3'

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden mit dem Reinheitsgrad der Gelfiltration von der Firma TIB Molbiol (Berlin) synthetisiert, in einer Konzentration von 10 µM in ddH₂O gelöst und eingesetzt.

Sequenziermix:

AmpliAq. FS BigDyeTerminator

Applied Biosystems, USA

3.1.10 Geräte

Elektrophorese- und Blotsysteme

Horizontal-Elektrophorese-Systeme
GNA 100 und 200 mit EPS 301 (Hofer)

Vertikale-Elektrophorese-Systeme
SE 260 und 600 mit EPS 301 (Hofer)

Semi-Dry-Blotkammer Semiphor und
MultiPhor II mit EPS 301 (Hofer)

Amersham Pharmacia
Biotech, Schweden

Amersham Pharmacia
Biotech, Schweden

Amersham Pharmacia
Biotech, Schweden

Zentrifugen / Rotoren

Tischzentrifugen Biofuge fresco

Untertischzentrifuge Minifuge 2

Kühlzentrifuge Superspeed RC-5B mit
folgenden Rotoren:
HB 4, GS 3, SM 24, SS34

Heraeus, Osterode

Heraeus, Osterode

Sorvall-Instruments,
Bad Homburg

Material

Mikroskope

Fluoreszenzmikroskop DM	RBE und Leitz, Wetzlar
Fotoeinheit	Leica, Solms
Konfokales Laserscan Mikroskop (Axioplan)	Zeiss, Jena
Lichtmikroskop Diavert	Leitz, Wetzlar

Sonstige Geräte

Automatischer Filmentwickler Agfa Curix 60	Aqua, Köln
BioToc Controller	Biometra, Göttingen
Brutschrank	Heraeus, Osterode
Durchfluscytometer BDFACSCanto™	Becton Dickinson, USA
Durchfluscytometer FACScalibur	Becton Dickinson, USA
Feinwaage 1608 MP	Sartorius, Göttingen
Homogenisator Sonoplus HD 2070	Bandelin, Berlin
Inkubationsschüttler Unitron	HT-Infors, Bottmingen,
pH-Meter 765 Calimatic	Knick, Berlin
Photometer Ultraspec 3300 pro	Amersham Pharmacia Schweiz
Reflotron	Roche, Mannheim
Sterilbank HeraSafe	Heraeus, Osterode
Thermocycler PTC-100 MJ	Research, USA
Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg
Tischschüttler Duomax	1030, Heidolph
Universalwaage	Sartorius, Göttingen
UV-Tisch UV-Biometra TB mit Kamera BioToc und	
Video Monitor WV-BM 900	Panasonic, Taiwan
Wasserbad GFL 1083	GFL, Burgwedel
Imaging Plate BAS-III	FujiFilm, USA
Scanner Fujifilm BAS-2500	FujiFilm, USA
Eraser für Imagin Plate	Raytest, Straubenhardt
Fluor-S™ MultiImager	BioRad, München
MicroLumat LB 96P	Berthold, Bad Wildbad

3.1.11 Zelllinien und Bakterienstämme

Eukaryontische Zelllinien

huh7: Zelllinie eines humanen hepatozellulären Karzinoms (Nakabayashi et al., 1982)

huH9-13: Zellklon 9-13 einer huh7 Zelllinie stabil transfiziert mit einem subgenomischen HCV-Genom des Genotyps 1b. Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Bartenschlager. HCV-Replikon: I₃₇₇/NS3-3' (Frese et al., 2003, Lohmann et al., 1999)

huh ET: Zellklon 9B einer huh7 Zelllinie stabil transfiziert mit einem subgenomischen HCV-Reporter-Genom des Genotyps 1b. Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Bartenschlager. HCV-Replikon: I₃₈₉/NS3-3'/LucUbiNeo-ET (Frese et al., 2003)

Bakterienstämme

E. coli K12 DH5 α (Gibco, USA; DSMZ Nr.: 6897); *F*⁻, *endA1*, *hsdR17*(*rk*⁻, *mk*⁺), *supE44*, *thi1*, *lambda*⁻, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, \emptyset 80dlacZ M15

3.1.12 Mäuse

Inzucht FVB/N-Mäuse (FVB/N CrIBR) wurden bezogen von Charles River Laboratories, Sulzfeld.

Material

3.1.13 Puffer und Medien

Alkalische Phosphatase Puffer

100 mM NaCl
50 mM MgCl₂
100 mM Tris-HCl
pH 9,5

Ampicillin-Stammlösung (1000x)

5 g Ampicillin
ad 50 ml ddH₂O
sterilfiltrieren, Lagerung bei 4 °C

Annexinpuffer

10 mM Hepes
140 mM NaCl
5 mM CaCl₂
pH 7,4

Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)

96 ml Chloroform
4 ml Isoamylalkohol

Coomassie-Färbelösung für

Polyacrylamidgele
0,8 g Coomassie brilliant blue R250
200 ml Methanol
200 ml ddH₂O
40 ml Eisessig

DNA-Lysepuffer

17mM Tris/HCl, pH 7,5
17mM EDTA
170mM NaCl
0.85% SDS

Ethidiumbromid-Stammlösung

1 g Ethidiumbromid
ad 100 ml ddH₂O

Formaldehyd-Fixierlösung

10% Formaldehydlösung (37%) in PBS

L-Glutaminlösung für die Zellkultur

29,2 g L-Glutamin für die Gewebekultur
add 1 l ddH₂O
sterilfiltrieren, Lagerung bei -20 °C

Labeling-Mix für die DNA-Sequenzierung

7,5 µM dGTP
7,5 µM dCTP
7,5 µM dATP
7,5 µM dTTP
Lagerung bei -70 °C

Ladepuffer (Für DNA-Agarosegele)

30 ml Glycerol
250 mg Bromphenolblau
250 mg Xylencyanol
250 mg Orange G
ad 100 ml mit TAE-Puffer

Laufpuffer für die SDS-PAGE

30,28 g Tris
144 g Glycin
10 g SDS
ad 1000 ml ddH₂O

LB-Agarplatten mit Ampicillin

15 g Bactoagar
1 l LB-Medium
autoklavieren, nach Abkühlung auf ca.
50 °C mit Ampicillin versetzen
(Endkonzentration 100µg/ml Ampicillin
bzw. 25 µg/ml Kanamycin) und die Platten
sofort gießen

LB-Medium

10 g Bactotryptone
5 g Bacto-Hefeextract
5 g NaCl
in 1 l ddH₂O lösen und autoklavieren

Luciferase Puffer

20mM Tricine, pH 7.8
470µM Luciferin
530µM ATP
1,07 mM (MgCO₃)₄Mg(OH)₂•H₂O
2,67mM MgSO₄
0,1mM EDTA
33,3mM DTT
pH 7,8 (mit H₃PO₄)
Lysepuffer mit Triton-X-100

Material

150 mM NaCl
0,5 mM EDTA
1% Triton-X-100
20 mM Tris/HCl
ad 50 ml ddH₂O
pH 7,4

PBS (10X)
400 g NaCl
10 g KCl
57,5 g Na₂HPO₄·2H₂O
10 g KH₂PO₄
ad. 5 l ddH₂O
pH 7,4
autoklavieren

PBST
1000 ml PBS
500 µl Tween-20

Ponceau S Lösung
3% Trichloressigsäure
2% Ponceau S
ddH₂O

Probenpuffer für die SDS-PAGE
(reduzierend)
6 % SDS
20 % Glycerol
10 % DTT
0,1 mg/ml Bromphenolblau
0,1 mg/ml Orange G
0,2 M Tris-HCl pH 6,8
aliquotiert bei -20 °C lagern

PVDF-Puffer
1x TBS
0,2% Milchpulver
0,1% Tween20

Sammelgelpuffer (4x) für Polyacrylamidgele
0,5 M Tris-HCl pH 6,8
0,4% SDS

SDS-Lysepuffer, denaturierend
200 mM Tris/HCl, pH 8,8
5 mM EDTA
0,1% Bromphenolblau

10% Sucrose
3.3% SDS
2% 2-Mercaptoethanol

SSC (20x)
175,3 g NaCl
88,2 g Na₃Citrat+2H₂O
ad 1 l ddH₂O
pH 7,0

Strip-Puffer
200 mM Glycin
1% SDS
pH 2,5

TAE-Puffer (50x) für die
Agarosegelelektrophorese
242 g Tris
57,1 ml Essigsäure
100 ml 0.5 M EDTA-Stammlösung
pH 8,0
ad 1000 ml ddH₂O

TAE-Puffer (5x)
500 mM Tris
415 mM Essigsäure
5 mM EDTA
bei Raumtemperatur lagern

TBST
150 mM NaCl
0,05 % Tween 20
50 mM Tris/HCl pH 7,5

TE-Puffer
10 mM Tris-HCl pH 8,0
1 mM EDTA
in H₂O autoklavieren

TFB1-Puffer
100 mM Rubidiumchlorid
50 mM Manganchlorid
30 mM Kaliumacetat
10 mM Calciumchlorid
15% Glycerol
sterilfiltrieren, Lagerung bei 4°C, pH 5,8

Material & Methoden

TFB2-Puffer	Western-Blot-Analyse Anodenpuffer I
10 mM Rubidiumchlorid	300 mM Tris
75 mM Calciumchlorid	20% (v/v) Methanol
15% Glycerol	vor Gebrauch entgasen
sterilfiltrieren, Lagerung bei 4 °C	
10 mM MOPS	Western-Blot-Analyse Anodenpuffer II
pH 8,0	25 mM Tris
	20% (v/v) Methanol
	vor Gebrauch entgasen
Trenngelpuffer für Polyacrylamidgele	
0,4% SDS	Western-Blot-Analyse Kathodenpuffer
1,5 M Tris-HCl	40 mM Capronsäure
pH 8,8	20% Methanol
	vor Gebrauch entgasen

3.2 Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung, Konservierung und Zellernte von Bakterien

Bakterien (*E. coli*) wurden bei 37 °C im Inkubationsschüttler in LB-Medium oder auf Agar-Platten inkubiert. Bei transformierten Stämmen wurde das entsprechende selektionierend wirkende Antibiotikum zugesetzt (Endkonzentration: 0,1 mg/ml Ampicillin) (Sambrook *et al.*, 1989). Kulturen für Plasmid-Minipreparationen wurden ausgehend von Einzelkolonien auf LB-Agar-Platten, Kulturen für Plasmid-Maxipreparationen ausgehend von Kulturen für Plasmid-Minipreparationen oder aus Glycerolstocks in LB-Medium angeimpft und über Nacht inkubiert. Zur dauerhaften Konservierung von Bakterienstämmen wurden 500 µl einer stationären Übernachtskultur mit 500 µl 87 % Glycerin versetzt und bei –20 °C aufbewahrt. Um Bakterienkulturen zu ernten, wurden je 500 ml-Ansätze 30 min. bei 6.000 rpm im GS3-Rotor zentrifugiert. Die Bakterienpellets wurden mit ca. 20 ml PBS gewaschen und erneut 30 min. bei 6.000 rpm zentrifugiert. Entweder wurden die Pellets anschließend sofort weiterverarbeitet oder bei –20°C aufbewahrt.

3.2.2 Herstellung kompetenter Bakterien

Um für die Aufnahme von Plasmid-DNA kompetente Bakterien zu generieren, wurden 800 ml LB-Medium mit 10 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* DH5α angeimpft und bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase (OD600 = 0.5) inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien steril abzentrifugiert und in 50 ml eiskaltem TFB1 Puffer resuspendiert. Nach einer Inkubation von 90 min. auf Eis wurden die Bakterien im vorgekühlten Rotor abzentrifugiert und in 15-20 ml TFB2 resuspendiert und nach Aliquotierung in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei –80 °C.

Methoden

3.2.3 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Für eine Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde, je nach benötigter Plasmid-DNA-Menge, der QIAprep Spin Miniprep Kit oder, für eine größere Ausbeute, der QIAprep Maxiprep Kit nach den Angaben des Herstellers Qiagen verwendet. Sie basieren auf dem von Birnboim und Doly (Birnboim & Doly, 1979) beschriebenen Verfahren. Dabei werden die Bakterien unter alkalischen Bedingungen partiell lysiert und die bakterielle DNA sowie die Proteine denaturiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte aus 500 ml Übernachtskulturen nach Ernte der Bakterien. Anschließend wurde sie bei -20°C gelagert.

3.2.4 Gelelektrophorese von DNA

Aufgrund ihres negativ geladenen Phosphat-Rückgrats bewegen sich DNA-Moleküle in Richtung Anode und können somit im elektrischen Feld elektrophoretisch aufgetrennt werden. Dabei ist die Beweglichkeit der DNA weitgehend von der Molekülgröße und ihrer Konformation abhängig. Kompakte, superhelikale Plasmide wandern schneller als weniger kompakte, relaxierte Plasmide, bei linearisierter DNA erfolgt die Auftrennung dagegen allein der Molekülgröße entsprechend.

Die Elektrophorese wurde sowohl zu analytischen als auch zu präparativen (vergl. 3.2.5) Zwecken eingesetzt. Die Auftrennung von DNA-Molekülen erfolgte in 1%igen (w/v) Agarosegelen in TAE-Puffer in einer horizontalen Gelelektrophoresekammer bei einer Spannung von 80 – 100 V in 1x TAE-Puffer für 45 – 60 min.. Zur Visualisierung der DNA unter UV-Licht wurde die flüssige Agarose mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Die DNA-Proben wurden mit 1/6 Volumen Ladepuffer (6fach) gemischt und aufgetragen. Zur Bestimmung der Basenzahl wurde ein entsprechender Längenstandard mit aufgetragen.

3.2.5 Präparative Agarosegelelektrophorese und DNA-Reinigung

Die Agarosegelelektrophorese wurde auch zur Auftrennung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus PCR und/oder Restriktionsverdauen im präparativen Ansatz benutzt. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Fragmente (vergl. 3.2.4) wurde das gewünschte DNA-Fragment mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mittels QIAquick-PCR-Purification-Kit nach dem Standardprotokoll des Herstellers Qiagen gereinigt. Das Prinzip der Reinigung beruht auf der Bindung von DNA an Silica-Material, wie z.B. Glas, in Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotroper Salze (z.B. Natriumiodid). Nach dem Waschen mit einem Salz-Ethanol-Puffer wird die DNA durch Lösungen mit geringen Salzkonzentrationen (50 μl Wasser oder EB-Puffer) wieder eluiert.

Methoden

3.2.6 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren

Die Extinktion der Nucleinsäuren wird photometrisch bei 260 nm bestimmt. Einer Extinktion von 1 entspricht eine Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 35 µg/ml einzelsträngiger DNA oder RNA und folgt dem Lambert-Beer'schen Gesetz. Das Verhältnis der Extinktionen von OD₂₆₀ zu OD₂₈₀, das ein Maß für die Reinheit der Präparation darstellt, sollte bei 1.8 - 2.0 liegen. Geringere Werte spiegeln eine Verunreinigung mit Proteinen wider. Lambert-Beer'sches Gesetz:

$$A = \varepsilon * c * d$$

A = Absorption; ε = Extinktionskoeffizient; c = Konzentration; d = Schichtdicke der Küvette

3.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (*polymerase chain reaction*) ist ein *in vitro*-Verfahren zur selektiven Amplifizierung von DNA-Fragmenten. Dabei wird von einer thermostabilen DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) nach Denaturierung des zu amplifizierenden DNA-Doppelstranges und anschließender Hybridisierung von Primern an die einzelsträngige DNA-Matrize (*annealing*) die Amplifikation des entsprechenden Doppelstranges katalysiert. Die Synthese beginnt vom 3'-OH Ende des Primers aus und benötigt Desoxyribonukleosid-triphosphate (dNTP's). Durch ein gegenläufig orientiertes Primerpaar und die zyklische Wiederholung des Vorganges kann die DNA-Sequenz zwischen den beiden Primern gezielt vervielfältigt werden. Polymerasen mit zusätzlicher 3'-5'-Exonuklease-Aktivität (*proofreading function*) wurden für die Generierung von NS5A-Deletionskonstrukten verwendet (Herkulase). Die Reaktion erfolgte im Thermocycler. Die Ausbeute der PCR wurde durch Auftrennung der Fragmente auf analytischen Agarosegelen überprüft (vergl. 3.2.4).

PCR für NS5A Deletionsmutanten:

- DNA (pcDNA-NS5A) → 100 ng
- Advantage buffer (10x) → 10 µl
- Forward Primer → 100 pmol
- Reverse Primer → 100 pmol
- dNTP- Mix (50x) → 200 µM
- Polymerase (Herkulase) → 0,5 µl
- H₂O add 50 µl

PCR-Programm:

1. 95°C → 5 min.
2. 95°C → 1 min.
3. 55°C → 1 min.
4. 68°C → 2 min.
5. zurück zu 2.; 25x
6. 68°C → 10 min.
7. 4°C → ∞
8. Ende

Methoden

3.2.8 Restriktion von DNA

DNA kann *in vitro* mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen gespalten werden. Für molekularbiologische Experimente werden Typ II Enzyme eingesetzt, die spezifisch innerhalb einer palindromen Erkennungssequenz spalten, wobei entweder glatte Enden (*blunt ends*) oder überhängende Enden (*sticky ends*) entstehen können. Es wurden präparative Restriktionen durchgeführt, sowohl von Plasmid-DNA aus Mini- oder Maxipräparationen, als auch von PCR-Amplifikaten. Im Falle eines Doppelverdau wurde die Reaktion mit zwei Restriktionsenzymen gleichzeitig durchgeführt.

Die Restriktionsansätze setzten sich wie folgt zusammen:

<u>DNA aus</u>	<u>DNA</u>	<u>Restriktionsenzym</u>
PCR:	30 µl	20 U
Miniprep:	ca. 1 µg	10 U
Vektor aus Maxiprep:	5-10 µg	20 U

Die Proben wurden je nach verwendeten Restriktionsenzymen nach Angaben des Herstellers (Roche, Mannheim) mit den empfohlenen 10x Puffer versetzt (Endkonzentration 1x), mit ddH₂O auf ein kleinstmögliches Volumen aufgefüllt und in der Regel 1 h bei 37°C inkubiert. Zur Analyse wurden die geschnittenen DNA-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt (vergl. 3.2.4)

3.2.9 Dephosphorylierung von DNA (Cipen)

Durch das Entfernen der 5'terminalen Phosphatgruppen durch die Behandlung linearisierter Vektoren mit alkalischer Phosphatase (*calf intestinal phosphatase*, CIP) wird die Religation linearisierter Vektoren mit komplementären Enden verhindert. Es wurden 15 µg linearisierte DNA mit 1/10 des 10x CIP-Puffer und mit 5 U alkalischer Phosphatase versetzt, 30 min. bei 37°C inkubiert und nach Zugabe weiterer 5 U Enzym erneut für 30 min. inkubiert. Die Phosphatase wurde bei 68°C für 10 min. inaktiviert, und die DNA über QIAquick-Säulen nach Angaben des Herstellers Quiagen gereinigt (Elution: 20-50 µl H₂O oder Puffer EB).

3.2.10 DNA-Ligation

Im letzten Schritt der Konstruktion eines rekombinanten DNA-Moleküls wurden die Vektor-DNA und das DNA-Fragment mit Hilfe der T4-DNA-Ligase ligiert. Diese katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe und einer gegenüberliegenden freien 3'-Hydroxylgruppe unter ATP-Verbrauch. Ein Ligationsansatz (10

Methoden

µl Volumen) enthielt 100 ng geschnittene und dephosphorylierte Vektor-DNA sowie die mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaute Insert-DNA im molaren Verhältnis von Vektor zu Insert von ca. 1:4. Es wurden 1 µl des 10x Ligationspuffers (enthält ATP) und 2 Units der T4-DNA-Ligase verwendet und für 12 h bei 16 °C inkubiert. Zur Überprüfung der Religation des Vektors wurde parallel ein Ligationsansatz ohne Insert durchgeführt. Mit den Ligationsansätzen wurden anschließend kompetente Bakterien transformiert (vergl. 3.2.11).

3.2.11 Transformation kompetenter Bakterien

Um Plasmid-DNA in kompetente Bakterien einzuschleusen, wurde eine DNA-Lösung (Plasmid- bzw. Ligationsansatz, ca. 50-100 ng DNA) mit 100 µl Suspension kompetenter Zellen versetzt und für mindestens 30 min. auf Eis inkubiert. Der anschließende Hitzeschock erfolgte für genau 90 sec. bei 42°C. Im Anschluss erfolgte eine 5 minütige Abkühlung auf Eis. Nach dem Zusatz von 900 µl kaltem LB Medium und der Inkubation für 90 min. bei 37°C unter Schütteln wurden die Bakterien auf Selektions-LB-Agarplatten verteilt. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Kontrolle der Wirksamkeit der Antibiotika wurde ein Ansatz ohne Zugabe von DNA mitgeführt. Die Effizienz der Transformation wurde durch Auszählen der Kolonien nach ca. 16-24 h bestimmt. Um die erhaltenen Klone zu charakterisieren, wurden einige Klone von der entsprechenden Platte abgenommen und Miniprep-Kulturen (vergl. 3.2.3) angeimpft.

3.2.12 Charakterisierung rekombinanter Klone

Die aus rekombinanten Bakterien isolierte Plasmid-DNA wurde mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen (vergl. 3.2.8) gespalten, im Agarosegel analysiert (vergl. 3.2.4) und damit die Insertion des Fragmentes und dessen Orientierung getestet. Eine letzte Gewissheit in Bezug auf Vollständigkeit des Inserts und möglicher Punktmutationen brachte eine Sequenzierung der positiven Klone (vergl. 3.2.13).

3.2.13 Sequenzierung von DNA

Die DNA-Sequenzierung nach Sanger et al. (Sanger et al., 1977) wird auch als Kettenabbruch- oder Didesoxynukleotidverfahren bezeichnet. Grundlage ist die PCR (vergl. 3.2.7) unter Verwendung von Didesoxynukleotiden, die zum Abbruch der Reaktion führen, weil die OH-Gruppe am 3'-C-Atom fehlt. Ist jedes der vier Didesoxynukleotide mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert, kann die Sequenz anhand der Fluoreszenzsignale nach Auftrennung der entstandenen Fragmente in einem Gel bestimmt werden. Für die Sequenzierung wurde der „Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix“ von PE Applied Biosystems verwendet.

Methoden

Sequenzieransätze für pcDNA- NS5A und

pcDNA-NS5A-Deletionsmutaten

- DNA → 300-500 ng
- Sequenziermix* → 2,5 µl
- Primer → 0,5 pM
- H₂O add 15µl → 10 µl

*Sequenziermix nach Herstellerangaben

PCR-Programm:

1. 96°C → 2 min.
2. 96°C → 30 sec.
3. 55°C → 5 min.
4. 60°C → 4 min.
5. zurück zu 2.; 34x
6. 60°C → 10 min.
7. 4°C → 99 h
8. Ende

Die Kapillarelektrophorese wurde in der Sequenzier-Abteilung des Robert-Koch-Instituts durchgeführt und die übermittelten Ergebnisse mit dem Programm ‚Sequencer 3.1‘ auf einem G4 Mac-Computer ausgewertet.

3.2.14 RNA-Isolation aus Säugerzellen, cDNA-Synthese und Gen-Expressionsanalyse

Um Expressionsunterschiede zwischen verschiedenen Replicon-Zelllinien auf mRNA-Ebene zu untersuchen, wurden auf Nylon-Membranen basierende Genexpressionsanalysen durchgeführt. Dabei wurde Gesamt-RNA von huh9-13 und huh ET Zellen nach mehrstündiger Inkubation mit TNF α präpariert. Die Behandlung mit TNF α allein führte nicht zu einer Induktion von Apoptose, simuliert aber den Einfluss einer Stimulation mit TNF α auf die Genexpression im Falle einer Apoptoseinduktion. Mit Hilfe der präparierten RNA wurde radioaktiv markierte cDNA hergestellt und die entsprechenden Nylon-Membranen, auf denen mehrere für die Apoptose relevante Gene in Form von DNA-Proben vertreten sind, mit dieser inkubiert, gewaschen und ausgewertet. Um die Membranen untereinander vergleichen zu können, enthalten sie interne Standards, auf die die Signale abgeglichen werden.

RNA-Präparation

Die Isolierung von Gesamt-RNA für Genexpressionsanalysen von huh9-13 und huh ET Replicon-Zellen erfolgte mit Hilfe des peqGOLD TriFast™-Reagenzes. Dabei handelt es sich um eine monophasische Phenol-/Guanidinisothiocyanat-Lösung zur gleichzeitigen Extraktion von RNA, DNA und Proteinen. Die Methode basiert auf einer Ein-Schritt-Flüssigphasen-Separation, entwickelt von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski & Sacchi, 1987). Die

Methoden

Extraktion erfolgte dabei nach den Angaben des Herstellers mit folgenden Abweichungen bzw. Besonderheiten:

Es wurden je 1×10^6 Zellen in einer 10 cm Schale ausgelegt. Zwei Tage später wurden die Zellen nach mindestens 12 stündiger TNF α Stimulation (1000 U/ml) mit PBS gewaschen. Die Lyse der Zellen erfolgte nach vollständiger Aspiration des PBS durch die direkte Zugabe von 1,25 ml des Reagenzes. Das Waschen der durch Isopropanol gefällten RNA erfolgte entgegen den Angaben mit 75% saurem Ethanol (75% Ethanol, 25% 0,1 mM NaAc, pH 5,2). Dies erhöht die Haftung des RNA-Pellets am Boden des Zentrifugenröhrchens und erleichtert ein vollständiges Entfernen des Überstandes.

Um DNA-Kontaminationen zu entfernen, wurde die RNA im Anschluss einem DNase I-Verdau unterzogen. Hierfür wurde die Gesamt-RNA auf 0,1 $\mu\text{g/ml}$ verdünnt und mit 1 U RQ1 RNase-free DNase pro μg RNA und 1 U/ μl RNasin[®] Ribonuclease Inhibitor für 30 min. bei 37°C im mitgelieferten 1x RNase-Reaktionspuffer inkubiert.

Um die Proben von Enzymen und Puffersubstanzen zu reinigen, die für die folgende cDNA-Synthese störend sein könnten, wurden die Proben mit nukleasefreiem Wasser auf 400 μl aufgefüllt und mit 400 μl Roti[®]-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (redestilliertes, in TE-Puffer äquilibriertes Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1, pH 7,5–8,0) für 1 min. stark geschüttelt. Die Proben wurden 1 min. bei RT mit 13000 g zentrifugiert, die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 400 μl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt, erneut geschüttelt und zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde mit 40 μl 3M NaAc (pH 5,2) und 1 ml Ethanol versetzt, gut gemischt und die RNA für mindestens 2 h bei -20°C gefällt. Anschließend wurde die gefällte RNA für 20 min. bei 13000 g und 4°C pelletiert, mit 1 ml saurem Ethanol gewaschen (75% Ethanol, 25% 0,1 mM NaAc, pH 5,2), das Pellet für ca. 10–15 min. bei RT im offenen Reaktionsgefäß getrocknet und in nukleasefreiem Wasser gelöst. Der Zustand der RNA wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft (vergl. 3.2.4). Bei intakter RNA sollten die 18S rRNA und die 28S rRNA bei ~ 2 kb und ~ 5 kb detektiert werden können. Um letzte DNA-Verunreinigungen aus den Proben zu entfernen, wurden die RNA-Präparationen für 30 min. bei 37°C mit DNaseI behandelt und die DNaseI anschließend für 10 min. bei 65°C inaktiviert. Der Erfolg der DNaseI Behandlung wurde mit Hilfe einer PCR auf Aktin überprüft (vergl. 3.2.7).

Methoden

PCR auf Aktin

- DNA → 1 µl
- Taq buffer (10x) → 10 µl
- MgCl₂ (50 mM) → 1 µl

- humBAct f (100 µM) → 0,1 µl
- humBAct b (100 µM) → 0,1 µl
- dNTP- Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 25 mM pro Desoxynukleotid) → 0,25 µl
- Taq Polymerase → 0,25 µl
- H₂O add 25 µl → 19,8 µl

PCR-Programm:

1. 95°C → 10 min.
2. 95°C → 1 min.
3. 55°C → 1 min.

4. 72°C → 1 min.
5. zurück zu 2.; 35x
6. 72°C → 10 min.
7. 4°C → ∞
8. Ende

Der Erfolg der PCR und auch der Zustand der RNA nach dem DNaseI Verdau wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (vergl. 3.2.4) überprüft. Gelagert wurde die RNA anschließend bei -80°C. Um radioaktiv markierte cDNA herzustellen, wurde nur intakte RNA verwendet, die nach DNaseI Verdau kein Signal mehr für β-Aktin in der PCR aufwies.

cDNA-Synthese

Die reverse Transkription zur Herstellung von cDNA wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt (BD AtlasTM cDNA Expression Arrays, BD Biosciences). Zusammenfassend wurde aus je ca. 50 µg Total-RNA die mRNA mit Hilfe von biotinylierten Oligo(dT) und magnetischen, mit Avidin gekoppelten *beads* isoliert (Protokoll: AtlasTM Pure Total RNA Labeling System, BD Biosciences). Die *beads* wurden anschließend in 6 µl H₂O aufgenommen, wobei die Hybridisierung von Oligo(dT) DNA-Stücken an die poly(A)-Enden der mRNA ausgenutzt wird. Der Komplex aus biotinylierten Oligo(dT)s und mRNA kann über eine Avidin/Biotin-Interaktion an die magnetischen Kügelchen binden. Diese lassen sich anschließend mit einem Magnet sammeln und fixieren, so dass eine schnelle Isolierung der mRNA gewährleistet ist. Die anschließende cDNA-Synthese wurde unter Verwendung von 2 µl CDSs Primer Mix pro Ansatz in Anwesenheit von $\gamma\text{P}^{32}\text{-ATP}$ (10 µCi/µl) und mit Hilfe von MMLV reverser Transcriptase (RT) durchgeführt. Um überschüssiges $\gamma\text{P}^{32}\text{-ATP}$ aus den Ansätzen zu entfernen, wurde die cDNA über Säulchen aufgereinigt und die Aktivität gemessen (Protokoll: BD Atlas cDNA Expression Arrays, BD Biosciences). Für die anschließenden Genexpressionsanalysen wurde die Sonde nur verwendet, wenn sie eine deutliche Radioaktivität aufwies.

Methoden

Gen-Expressionsanalyse

Um die Genexpressoin bestimmter für die Apoptose wichtiger Gene zu überprüfen, wurden Membranen des *Atlas human Apoptosis Array* (7743-1) von BD Biosciences (Clontech) nach den Angaben des Herstellers verwendet (Protokoll: BD Atlas cDNA Expression Arrays, BD Biosciences). Dafür wurden die Membranen mit DNA aus Lachsspermien blockiert und die markierte cDNA unter Zusatz von C₀t-1 DNA über Nacht bei 68°C rotierend inkubiert. Die Membranen wurden 4 mal mit 2x SSC (1% SDS), 1 mal mit 0,5x SSC (1% SDS) und 2 mal mit 0,25x SSC (0,5% SDS) für je ca. 10 min. bei 68°C gewaschen. Um sie vor der Austrocknung zu bewahren, wurden die Membranen luftdicht in Plastikfolie versiegelt. Die radioaktiven Signale wurden sowohl mit herkömmlichen Röntgenfilmen als auch mit einer *Imager* Platte ausgewertet. Dazu wurden mehrere Belichtungszeiten zwischen einigen Stunden und 2 Tagen aufgenommen und die belichteten Imager Platten in einem Scanner ausgewertet. Die Signalstärken wurden mit Hilfe des Programms Aida Image Analyzer quantifiziert und ausgewertet.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Kultivieren und Passagieren von Säugerzellen

Säugerzellen (huh7, huh913, huh ET) wurden in Vollmedium (DMEM mit 10% FCS, 100 µg/ml Streptomycin, 100 U/m Penicillin, 2 mM L-Glutamin) bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Feuchtigkeit inkubiert. Im Falle der Repliconzellen wurde dem Medium Neomycin (G418) hinzugefügt (huh9-13: 1 mM; huh ET: 250 µM). Bei einer Konfluenz von etwa 70% wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsiniert (1 ml Trypsin auf eine 75 cm²-Flasche, ca. 3 min.) und neu ausgelegt. Das Trypsin greift Oberflächenproteine der Zellen an, die für ihre Adhäsion nötig sind. Anschließend wurden die Zellen entweder entsprechend verdünnt auf neue Flaschen verteilt oder für Versuche gezählt und auf Schalen oder Platten ausgelegt.

3.3.2 Transfektion von Säugerzellen

Die zur Transfektion verwendete Substanz Ex-Gene500 (Fermentas) ist ein kationisches Polymer, das über seine positiven Ladungen die negativ geladene DNA bindet und in einem Komplex schützt. Dieser Komplex wird von den Zellen über Endozytose aufgenommen, und die DNA gelangt nach Freisetzung aus den Endosomen in den Zellkern, wo sie transkribiert werden kann. Für die Transfektion von Zellen einer 6 cm-Schale (ca. 1-2x10⁵ Zellen pro Schale) wurden die in Tabelle 6 angegebenen Plasmidmengen in ein Gefäß vorgelegt und 150 µl NaCl (150 mM) hinzugefügt. Nach Zugabe von 10 µl Ex-Gene und gutem Mischen wurden

Methoden

der Ansatz für 10 min. bei RT inkubiert, zu dem Medium der Zellen hinzugefügt und die Zellen für mind. 4 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Transfektionsmedium abgesaugt und durch neues Medium ersetzt. Nach einer zweitägigen Inkubation wurden die Zellen weiterverarbeitet. Zur Kontrolle einer erfolgreichen Transfektion wurde jeweils ein Ansatz mit einem Expressionsvektor für das grün fluoreszierende Protein (pEGFP) mitbearbeitet. Die EGFP-Expression wurde nach 2 Tagen in lebenden Zellen mit Hilfe eines inversen Fluoreszenz-Mikroskopes überprüft. Nur Experimente mit erfolgreicher EGFP Expression wurden für weitere die Analyse verwendet.

Tabelle 6: Plasmidmenge pro Transfektionsansatz

Experiment	Zweck	Plasmid	Plasmidmenge
4.2.1, 4.2.2	Expression von NS5A	pcDNA, pcDNA-NS5A	2 µg
4.2.3	Expression von NS5A-Deletionskonstrukten	pcDNA-NS5A, -31-449, -105-449, -211-449, -302-449,	2,5 µg
4.2.4	Expression von NS5A und transdominant-negativen Kinasen	pcDNA, pcDNA-NS5A	2,5 µg
		transdominant-negative Kinase bzw. entsprechende Kontrolle	0,5 µg

3.3.3 Aufschluss von Säugerzellen und Gewinnung löslicher Proteine

Je nach Verwendung wurden huh7 bzw. die Replicon-Zellen huh9-13 und huh ET direkt in 200 µl denaturierendem SDS-Lysepuffer pro 6 cm-Schale lysiert, die Lysate 3 min. bei 95°C inkubiert und für 3 sec. mit Ultraschall behandelt. So behandelte Proben konnten direkt auf ein SDS-Gel (vergl. 3.4.2) aufgetragen werden. Um definiertere Banden zu erhalten, wurden für einige Experimente die Zellen mit Triton-X-100 Lysepuffer (0,5 ml pro 6 cm Schale) und den Proteinaseinhibitoren Aprotinin (1µg/ml), Leupeptin (1µg/ml) und PMSF (1 mM) versetzt, mit einem Zellschaber auf Eis abgeschabt und dort für mindestens 10 min. in einem Eppendorfgefäß inkubiert. Anschließend wurden die Proben 45 min. bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand für Versuche verwendet. Für die Untersuchung dieser Proben mittels SDS-PAGE wurde zu 20 µl Probe 5 µl SDS-Probenpuffer hinzugefügt und die Proben 2 min. bei 95°C erhitzt. 20 µl der Proben wurde dann auf ein entsprechendes Gel aufgetragen.

3.3.4 Behandlung von huh7 Zellen mit verschiedenen Substanzen

Um in huh7 Zellen eine Aktivierung des MAP-Kinase-Weges unter Einbeziehung von Ras zu erreichen, wurde zu dem Zellmedium Erythrozyten-Wachstums-Faktor (EGF, 1:800) hinzugefügt (Endkonzentration 20 nM), die Zellen 30 min. bei 37°C inkubiert und anschließend geerntet. Sollte direkt die PKC in den Zellen aktiviert werden, so wurden die Zellen entsprechend mit PMA (1:1000; Endkonzentration 0,1 ng/ml) stimuliert. Zur Inhibition

Methoden

der Proteinkinase C wurden Zellen vor der Ernte über Nacht bei 37°C mit dem Inhibitor Gö 6976 inkubiert (100 nM). Um die Kinasen MEK1/2 zu inhibieren wurden die Zellen ebenfalls über Nacht bei 37°C mit den Inhibitoren U0126 (100 µM) oder PD 98059 (36 µM) inkubiert. Bei allen Experimenten zur Aktivierung des MAP-Kinase-Weges wurde zudem der FCS-Gehalt im Medium mindestens 12 h vor der Ernte von 10% auf 1% herabgesetzt.

3.3.5 Induktion von Apoptose in huh7 und Replicon Zellen

Um bei huh7 und den Replicon-Zelllinien huh9-13 und huh ET Apoptose zu induzieren, wurden die Zellen, wenn nicht anders angegeben, für 12 h bei 37°C mit den entsprechenden Substanzen inkubiert. Dabei wurden im Falle TNF α -vermittelter Apoptose 50 ng/ml TNF α (1000 U) und 10 µg/ml Cycloheximid (CHx) verwendet. Die Induktion des TRAIL-spezifischen Apoptoseweges wurde mittels 5 ng/ml Killer TRAIL mit Zusatz von 10 µg/ml CHx durchgeführt. Apoptose über den intrinsischen Weg wurde mit Hilfe von 80 µg/ml Etoposide in Verbindung mit 10 µg/ml CHx bzw. mit alleiniger Actinomycin D-Gabe (200 ng/ml) induziert.

3.3.6 Kurieren von Replicon Zellen

Um das Replicon aus den Zelllinien huh9-13 und huh ET zu entfernen, wurde die Zellen für 11 Tage mit 1 µl pegyliertem Interferon α (IFN α) pro 10 ml Medium (ca. 2000 U/ml Interferon α) behandelt und der Selektionsdruck durch G418 aufgehoben. Die Wirkung von IFN α auf das Replicon-System wurde bereits von Frese *et al.* (Frese et al., 2001) beschrieben. Zur Kontrolle wurden huh7 Zellen entsprechend behandelt. Um sicherzustellen, dass sich die Expression möglicher IFN α -induzierter Gene wieder auf das Expressionsniveau wie vor der IFN α -Behandlung einstellt, wurden die Zellen mindestens für zwei Wochen ohne IFN α in Kultur gehalten, bevor sie für Versuche verwendet wurden. Der Erfolg der Eliminierung des HCV Replicon wurde mit Hilfe von Immunfluoreszenzen (vergl. 3.5.1) und Western Blot Analysen (vergl.: 3.5.2) auf die NS5A Expression, bei den huh ET Zellen zusätzlich durch die Messung der Luciferaseaktivität (vergleiche: 3.4.4) überprüft.

3.4 Proteinchemische Methoden

3.4.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

Um gleiche Mengen an Protein in Experimenten einzusetzen, wurden die Proteinkonzentration in Zelllysaten nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976) bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung beruht auf einer Färbereaktion mit dem blauen Säurefarbstoff Coomassie Brilliant Blue G250. Durch die Bindung des Farbstoffes an die Seitenketten von

Methoden

Proteinen verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465 nach 595 nm. Das Bradfordreagenz wurde in einem Verhältnis von 1:5 mit der Probe gemischt und die Extinktion von Doppelproben nach 10 min. bei 595 nm gemessen. Diese Methode wurde nur bei Verwendung des Triton-X-100-haltigen Lysepuffers und des Lysepuffers für die Bestimmung der Luciferaseaktivität verwendet, da z.B. SDS und Farbstoffe die Methode unbrauchbar machen. In solchen Fällen wurden die Proteinmengen anschließend durch Western Blot-Experimente auf β -Aktin als Ladekontrolle quantifiziert (vergl. 3.5.2). Da die Bandenstärke ungefähr proportional zur aufgetragenen Gesamtproteinmenge ist, sind die Proben untereinander vergleichbar.

3.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

In Gegenwart von SDS können Proteine nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970) aufgrund ihres Molekulargewichtes gelelektrophoretisch aufgetrennt werden. Die Proteine werden bei der Probenvorbereitung durch β -Mercaptoethanol oder DTT reduziert und gleichzeitig unter dem Einfluss von SDS und hoher Temperatur denaturiert. Es bilden sich negativ geladene SDS-Protein-Komplexe mit einem konstanten Masse-Ladungs-Verhältnis, die sich nur noch in ihrer Größe unterscheiden und daher nach dieser Größe im elektrischen Feld aufgetrennt werden können.

Im Zuge dieser Arbeit wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE angewendet, bei der ein großporiges Sammelgel (5%; pH 6,8) und ein engporiges Trenngel (pH 8,3) Verwendung finden. Dadurch erhält man bei der Auftrennung scharfe Proteinbanden. Die Zusammensetzung des Trenngels wird dabei der Größe des gesuchten Proteins angepasst. Es wurden Trenngele mit 8%, 10% und 12% Polyacrylamidanteil in dem entsprechenden Trenngelpuffer verwendet. Um die Vernetzungsreaktion zu starten, wurde 10% APS (Ammoniumperoxydisulfat) und für eine bessere Vernetzung 0,75% TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylaminomethan) dem Acrylamid/Puffer-Gemisch beigefügt.

Zur Denaturierung der Proteinproben wurden die Proben mit der entsprechenden Menge an 2x bzw. 5x Denaturierungspuffer versetzt und bei 95°C für 3 min. erhitzt. Der Gellauf erfolgte mit dem Laufpuffer bei 120-170 V pro Gel in einer vertikalen Gelelektrophoresekammer. Es wurden Minigele (6 cm x 9 cm) verwendet, wobei 20-40 μ l Probe pro Tasche aufgetragen und ein Molekulargewichts-Längenstandard, der den erwarteten Größenbereich abdeckte, verwendet wurde.

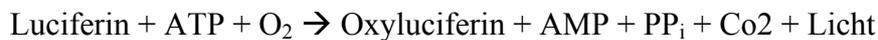
Methoden

3.4.3 Sterilfiltration

Um größere Partikel aus Lösungen zu entfernen und diese dadurch zu sterilisieren, wurden die Lösungen sterilfiltriert. Dazu wurde die Probe in eine sterile Spritze entsprechenden Volumens gefüllt und durch einen Sterilfilter (Porendurchmesser 0,2 µm) gedrückt. Partikel größer als 0,2 µm wurden vom Filter zurückgehalten und nur Moleküle, die kleiner als 0,2 µm waren, verblieben in der Probe.

3.4.4 Bestimmung der Luciferaseaktivität in Repliconzellen (Reportergenassay)

Das Replicon der huh ET Zellen enthält zusätzlich zu dem Gen für die HCV-Proteine ein Gen für das Protein Luciferase. Dieses Enzym der Feuerfliege ist in der Lage, folgende Reaktion zu katalysieren:



Die Anzahl der emittierten Lichtquanten ist unter bestimmten Bedingungen proportional zur Anzahl der Luciferasemoleküle, und die Expression dieser Moleküle ist wiederum direkt an die HCV-Replikation des Replicon-Konstruktes gekoppelt. Dadurch ist eine direkte und sehr sensitive Detektion und Quantifizierung der Replikation möglich, wie von Krieger et al. 2001 beschrieben. Um die Replikation in den verwendeten huh ET Zellen zu bestimmen, wurden 5×10^5 Zellen mit 50 µl eines *passive lysis buffer* für Luciferase Assays der Firma Promega 10 min. bei RT inkubiert. Das Lysat wurde anschließend 5 min. bei 13.000 rpm zentrifugiert, 50 µl des Überstandes auf eine 96-Loch Platte aufgetragen und im Luminometer (MicroLumat; Berthold) vermessen. Als Substrat diente D(-)-Luciferin. Es wurden 50 µl des Substrates pro Messung verwendet, bei einer Verzögerung von zwei Sekunden und einer Messzeit von 10 Sekunden. Die Anzahl der emittierten Lichtquanten wurde als Relative-Licht-Einheit (RLU) erfasst und mit einem entsprechenden Programm (WinGlow, Berthold) ausgewertet.

3.5 Immunologische Methoden

3.5.1 Indirekte Immunfluoreszenz

Die indirekte Immunfluoreszenzfärbung eignet sich, um Expression und Lokalisation von Proteinen in Zellen oder Geweben festzustellen. Dabei emittieren Fluoreszenzfarbstoffe, die an Antikörper gekoppelt sind, nach Anregung durch eine bestimmte Anregungswellenlänge Licht einer bestimmten Emissionswellenlänge, das mit Hilfe entsprechender Mikroskope detektiert werden kann.

Methoden

Zur Untersuchung adhärent wachsender Zellen wurden diese auf Deckgläschen in 24-Lochplatten in einer Dichte von ca. $1,5 \times 10^4$ Zellen pro Deckgläschen ausgesät und mindestens einen Tag inkubiert. Nach der Entfernung des Mediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit Ethanol/DAPI-Mischung (4'-6-Diamidino-2-phenylindol; 1 $\mu\text{g/ml}$) 10 min. bei 4°C fixiert. DAPI ist ein blau-violett emittierender Fluoreszenzfarbstoff, der in DNA interkaliert und somit die Zellkerne anfärbt. Die Inkubation der Proben bei den anschließenden Schritten erfolgte bei Raumtemperatur. Nach der Fixierung wurden die Zellen 10 min. bei Raumtemperatur mit PBS-T (0,05% Tween 20) inkubiert und der antigenspezifische primäre Antikörper in der entsprechenden Verdünnung in PBS-T-Lösung (100 $\mu\text{l/Deckgläschen}$) auf die Deckgläschen gegeben (1-1.5 h, RT). Nach 3 Waschschritten (PBS-T, 5 min.) wurden die Präparate mit einem Fluorophor gekoppelten Sekundärantikörper (in PBS-T) für eine halbe Stunde unter Lichtausschluss behandelt und erneut gewaschen. Anschließend wurden die Präparate in CitiFluor (Glycerol/PBS-Gemisch) auf Objektträger gelegt und mit Nagellack versiegelt. Die Proben wurden bis zur Auswertung lichtgeschützt bei 4°C gelagert. Um Eigenfluoreszenz der Zellen bzw. Kreuzreaktionen der Antikörper auszuschließen, wurden Kontrollen ohne den ersten Antikörper verwendet. Die Auswertung der indirekten Immunfluoreszenz wurde entweder an einem Fluoreszenzmikroskop, das mit einer Kamera ausgerüstet war, oder an einem konfokalen Laserscanmikroskop, das mit einem PC mit bildverarbeitenden Programmen vernetzt war, durchgeführt. Da auch nach Transfektion gebildete Proteine mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht wurden, mussten Zellen zuvor in 6 cm-Schalen ausgelegt und transfiziert werden (vergl. 3.3.2). Diese Zellen wurden dann am nächsten Tag auf die Objektträger in 24-Lochplatten, mit einer Dichte von $1,5 \times 10^4$ Zellen pro Objektträger, ausgelegt. Vor der Analyse erfolgte eine Inkubation für weitere 48 h bei 37°C.

3.5.2 Western Blot

Beim Blotten von Proteinen werden die einzelnen Komponenten einer Proteinmischung nach gelelektrophoretischer Auftrennung auf eine Membran transferiert, wo sie aufgrund hydrophober Interaktionen haften bleiben. Diese können dann einer Nachweisreaktion unterzogen werden. Die durch SDS-PAGE (vergleiche: 3.4.2) aufgetrennten Proteine wurden nach der von Towbin *et al* (Towbin et al., 1992) beschriebenen Methode auf PVDF-Membranen transferiert. Der Transfer erfolgte nach dem *semi-dry*-Verfahren bei 1,39 mA/cm² für 50 min.

Der Erfolg des Transfers wurde mit Hilfe einer Färbung mit Ponceau S überprüft und die Banden des Proteinstandards auf der Membran markiert. Zudem fixiert die in der Färbelösung

Methoden

enthaltene Trichloressig-Säure die Proteine auf der Membran. Durch anschließendes Waschen in PBS konnte der reversible Farbstoff wieder entfernt werden. Nach dem Blocken unspezifischer Antikörperbindungsstellen (30 min.) wurde die Membran mit dem entsprechenden primären Antikörper für mindestens 1 h bei Raumtemperatur inkubiert (Puffer, Blockierlösung und Antikörper-Verdünnungen, vergl. 3.1.3, Tabellen 1&2), dreimal gewaschen (je 5 min.) und mit dem sekundären 1:2000 verdünnten Peroxidase-konjugierten Antikörper für 30 min. behandelt. Als Waschlösungen dienten je nach Antikörper PBS bzw. TBS, versetzt mit Tween20. Die Blotentwicklung erfolgte nach erneutem mehrmaligem Waschen. Als Substrat diente ein 1:1 Gemisch aus ECL1 und ECL2 beziehungsweise für eine höhere Empfindlichkeit ein 1:1 Gemisch der Komponenten des *SuperSignal West-Dura Detection* Reagenzes. Dessen Umsetzung durch die Peroxidase des sekundären Antikörpers führt zur Emission von Lichtquanten bei einer Wellenlänge von 425 nm. Die Detektion der Lichtquanten erfolgte durch Auflegen eines ECL-Röntgenfilms. Sollten die Signale quantifiziert werden, wurden die Signale in einem Fluor-S Multi Imager (BioRad) durch eine Kamera aufgezeichnet und digital gespeichert. Anhand dieser Daten konnten die verschiedenen Signale mit der Software Quantity One an einem Computer quantifiziert und zueinander ins Verhältnis gesetzt werden.

Um auf einem Blot nach einer Färbung weitere Proteine zu detektieren, wurde die Membran 1-2 h bei 37°C mit Strip-Puffer von den Antikörpern befreit. Nach ausreichendem Waschen des Blots konnte dieser, wieder bei der Blockierung beginnend, für die Detektion eines anderen Proteins verwendet werden.

3.5.3 Durchflusszytometrie (FACS, fluorescence activated cell sorting)

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die quantitative Analyse und Charakterisierung einzelner Zellen aufgrund ihrer morphologischen Eigenschaften (Größe und Granularität) und ihrer Fluoreszenz nach Anfärbung gewünschter Moleküle mit Fluoreszenzfarbstoffen.

In einem Flüssigkeitsstrom passieren die Zellen einzeln einen Laserstrahl. Das Streu- und Emissionslicht wird von speziellen Detektoren erfasst und gibt Auskunft über die Größe (*forward scatter*, FSC) und Granularität (*sideward scatter*, SSC) der Zelle. Bei den mit Fluoreszenzmarkern gefärbten Zellen kommt es je nach Anregung des Fluorophors zu einem Emissionslicht bestimmter Wellenlänge, welches von einem Photodetektor gemessen wird, wobei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig gemessen werden können. Die verwendeten Geräte enthielten einen Argonlaser (488 nm) für die Streulichtanalyse und zur Anregung der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoff, die bei den Wellenlängen 530 nm (FL1), 585 nm (FL2) und 650 nm (FL3) detektiert wurden. Die Parameter der Zellen wurden mit dem

Methoden

Programm Cell Quest pro bzw. BD FACS Diva analysiert. Die FACS-Analyse wurde zur Quantifizierung apoptotischer Zellen in einer Probe verwendet.

Auswertung

Da auch unstimulierte Zellen einen Anteil apoptotischer Zellen aufweisen, wurden bei jeder Versuchsreihe unstimulierte Zellen aller Zelllinien mit gemessen. Man erhält die eigentliche Anzahl apoptotischer Zellen, die von einer verwendeten Substanz in einer Probe induziert wird (Δ apoptotische Zellen), nach Abzug der apoptotischen Zellen ohne Stimulation von der Anzahl apoptotischer Zellen mit Stimulans (Δ apoptotische Zellen: stimuliert-unstimuliert). Da die aus den Messungen erhaltenen absoluten Werte größeren Schwankungen unterworfen sind, aber die Verhältnisse der einzelnen Proben untereinander immer ähnlich waren, wurden die absoluten Werte durch einen Normierungsfaktor relativiert. Als Normierungsfaktor wurde für eine zusammenhängende Versuchsreihe jeweils der Mittelwert der apoptotischen huh7 Zellen (Δ apoptotische Zellen) verwendet, stimuliert mit der entsprechenden Substanz, die in der Versuchsreihe verwendet worden war. Daraus ergab sich eine relative Anzahl apoptotischer Zellen, die sich in den einzelnen Proben „x-fach“ voneinander unterschieden, und die im Falle der huh7 Zellen jeweils in etwa bei 1 lag. Diese relativen Zahlen konnten anschließend zusammengefasst und untereinander verglichen bzw. statistisch ausgewertet werden. Im Folgenden ist eine Zusammenfassung der Ermittlung der relativen Anzahl apoptotischer Zellen gegeben.

apoptotische Zellen verursacht durch Stimulans:

Δ apoptotische Zellen = stimuliert-unstimuliert

relative Anzahl apoptotischer Zellen verursacht durch Stimulans:

rel. Δ apoptotische Zellen = Δ apoptotische Zellen/Normierungsfaktor

Angaben in Auswertungsgraphiken:

Mittelwert der rel. Δ apoptotischen Zellen = $\sum(\text{rel. } \Delta \text{ apoptotische Zellen aller Exp.}) / \text{Anzahl Exp.}$

Normierungsfaktor:

Mittelwert der Δ apoptotischen huh7 Zellen

3.5.4 Färbung für FACS-Analyse

Um apoptotische Zellen im Durchflusszytometer zu quantifizieren, wurde eine Annexin-V-Färbung in Kombination mit einer Propidiumiodid (PI)-Färbung durchgeführt. Dabei werden apoptotische Zellen mit Annexin-V, an das der grün fluoreszierende Farbstoff FITC bzw. FLUOS gekoppelt ist, markiert. Propidiumiodid ist ein rot fluoreszierender Farbstoff, der in

Methoden

die DNA interkaliert, aber genauso wie Annexin-V nicht die intakte Zellmembran passieren kann. Der Farbstoff FITC wird mit Licht der Wellenlänge 488 nm angeregt und emittiert Lichtquanten von 525 nm, welche in FL1 gemessen wurden. PI, über die gleiche Wellenlänge angeregt, weist eine starke Emission bei 620 nm auf, welche in FL2 oder FL3 gemessen wurde. Da nekrotische Zellen eine Schädigung der Zellmembran aufweisen, kann PI in nekrotische Zellen gelangen und diese anfärben. Annexin-V hingegen bindet über Ca^{2+} -Ionen an extrazellulär exponierte Phosphatidylserinreste apoptotischer Zellen. Phosphatidylserin ist bei vitalen Zellen auf der inneren Seite der Plasmamembran lokalisiert und wechselt im Laufe der Apoptose nach außen. Da auch Annexin-V durch stark beschädigte Membranen gelangen und nach innen gerichtetes Phosphatidylserin anfärben kann, ermöglicht erst die Gegenfärbung mit PI die Quantifizierung apoptotischer Zellen unter Ausschluss nekrotischer Zellen. Zu berücksichtigen ist jedoch, dass auch spät apoptotische Zellen die Integrität der Zellmembran verlieren und somit mit PI angefärbt werden können.

Um Zellen von 6-Loch Platten für die Analyse zu ernten, wurde für jede Probe der Überstand der Kulturgefäße gesammelt, die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen, mit 0,25 ml Trypsin abgelöst und die Trypsinreaktion mit 1 ml Medium gestoppt. Um so wenig Zellen wie möglich zu verlieren, wurden alle anfallenden Überstände gesammelt und die Zellen bei ca. 1000 rpm in 15 ml Falcon-Röhrchen abzentrifugiert. Das Pellet (ca. 5×10^5 Zellen) wurde mit 2 ml Annexinpuffer gewaschen, abzentrifugiert, und in 100 μl Annexinpuffer versetzt mit 2 μl Annexin-V-FLUOS bzw. 5 μl Annexin-V-FITC resuspendiert. Nach einer lichtgeschützten Inkubation von 20 min. bei RT wurden die Zellen mit 2 ml Annexinpuffer gewaschen, abzentrifugiert und für die Messung in 400 μl Annexinpuffer aufgenommen. Es wurde darauf geachtet, dass die Zellen von der Ernte bis zur Messung auf Eis gehalten wurden, abgesehen von der Färbung bei RT. Kurz vor der Messung wurden zu den Proben je 2 $\mu\text{g/ml}$ Propidiumiodid hinzugegeben und die Proben gut gemischt. Es wurden jeweils 30.000-50.000 Zellen im Bezug auf ihre Beschaffenheit und Fluoreszenzeigenschaften analysiert. Gegebenenfalls wurden die restlichen Zellen nach der Messung abzentrifugiert und für Proteinlysate verwendet (vergl. 3.3.3).

3.6 Methoden zur Charakterisierung NS5A-transgener Mäuse

Das im Folgenden untersuchte transgene Mausmodell wurde in einer dieser Doktorarbeit vorangegangenen Arbeit mit der Hilfe von Dr. Kurt Reifenberg (Universität Mainz) generiert. Die NS5A-Expressionskassette enthält NS5A (Genotyp 1b des Hepatitis C Virus; Gen-Bank-Nr.: D16435) unter der Kontrolle eines Maus-Albumin-Promotors (~340bp) und dem

Methoden

dazugehörigen *enhancer* (~2kb) (Chisari, 1989, Pinkert et al., 1987). Das β -Globin Intron wurde zur Steigerung der Transkription eingefügt (Brinster et al., 1988). NS5A selbst wurde als Fusionsprotein mit einem N-terminalen hexa-Histidine-*tag* und einem C-terminalen V5-Epitope exprimiert. Darauf folgt eine BGH poly-Adenylierungssequenz. Als Hintergrund wurden FVB/N-Mäuse gewählt. Da die Klonierung der Expressionskassette und die Erzeugung der transgenen Maus nicht Teil dieser Arbeit waren, werden sie im Folgenden nicht näher erläutert. Genauere Angaben sind in der Promotionsarbeit von Dr. rer. nat. Tilmann Bürkstümmer aufgeführt (Identification of cellular targets of Hepatitis C Virus Non-structural Protein 5A; 2005; FU-Berlin).

3.6.1 Gewinnung chromosomaler DNA aus Mausschwänzen und Genotypisierungs-PCR

Um NS5A-transgene und nicht transgene Mäuse voneinander unterscheiden zu können, mussten die Tiere mittels PCR genotypisiert werden. Dazu wurde aus den Schwanzspitzen der Tiere chromosomale DNA isoliert. Das Gewebe wurde zu diesem Zweck über Nacht bei 55°C mit 500 μ l DNA-Lysepuffer und Proteinase K (0,2 mg/ml) verdaut. Am nächsten Tag wurden die Proteine durch die Zugabe von 250 μ l gesättigter NaCl-Lösung unter 10 minütigem Schütteln und anschließender Inkubation von mindestens 10 min. auf Eis gefällt. Nach Zentrifugation mit 4500 g für 30 min. wurde die DNA aus 500 μ l Überstand mit 1 ml kaltem Ethanol (absolut) gefällt und bei 16000 g für 30 min. abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde anschließend mit 70% kaltem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet an der Luft getrocknet, bevor es in 100 μ l ddH₂O oder EB Puffer (Quiagen) für mindestens 2 h bei 37°C gelöst wurde. Reinheit und Konzentration der genomischen DNA wurden in Stichproben überprüft (vergl. 3.2.6)

Für die PCR (vergl. 3.2.7) wurde sowohl ein Primerpaar für das Transgen NS5A (fw: MK021, rw: MK022 bzw. fw: TB059; rw: TB: 60), als auch eines für Tubulin (fw: TB061; rw: TB062) zusammen in einem Ansatz verwendet. Letzteres Primerpaar diente der Überprüfung der DNA-Präparation. Es wurden ca. 1 μ g genomische DNA für die PCR eingesetzt.

Methoden

PCR für Mausgenotypisierung

- DNA → 2,5 µl
- Taq buffer (10x) → 10 µl
- MgCl₂ (50 mM) → 1 µl
- NS5A Vorwärts-Primer (100 µM) → 0,1 µl
- NS5A Rückwärts-Primer (100 µM) → 0,1 µl
- Tubulin Vorwärts -Primer (100 µM) → 0,1 µl
- Tubulin Rückwärts-Primer (100 µM) → 0,1 µl
- dNTP- Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 25 mM pro Desoxynukleotid) → 0,25 µl
- Taq Polymerase → 0,25 µl
- H₂O add 25 µl → 18,1 µl

PCR-Programm:

1. 95°C → 10 min.
2. 95°C → 1 min.
3. 55°C → 1 min.
4. 72°C → 1 min.
5. zurück zu 2.; 35x
6. 72°C → 10 min.
7. 4°C → ∞
8. Ende

3.6.2 Serumgewinnung von Mäusen

Um das Blutserum von transgenen und nicht transgenen Mäusen zu untersuchen, wurde einem Teil der Mäuse ca. 0,2 ml Vollblut entnommen. Die Blutgerinnung wurde durch Beschichtung der Eppendorfgefäße mit EDTA und Zugabe von 10 µl EDTA (0,5 M; pH 8,0; PBS) verhindert. Um das Serum zu erhalten, wurden die Blutproben 1-2 mal 10 min. bei 3000 g zentrifugiert, der Überstand (Serum) abgenommen und bis zur Analyse bei -80°C gelagert.

3.6.3 Messung von GPT

Das leberspezifische Enzym Alanin-Aminotransferase (ALT) bzw. Glutamat-Pyruvat Transaminase tritt im Falle einer Leberschädigung in die Blutbahn über. Als Maß der Leberschädigung wurde daher die ALT/GPT-Aktivität im Serum von Mäusen (vergl. 3.6.2) bestimmt. Dazu wurde das Reflotron Testsystem nach Angaben des Herstellers Roche verwendet und die Aktivität in enzymatische Einheiten pro Liter (U/L) angegeben.

3.6.4 Gewinnung von Organen

Um die Organe von Mäusen für verschiedene Versuche zu gewinnen, wurden die Mäuse durch CO₂-Inhalation getötet. Die Organe wurden entnommen und für die entsprechenden Versuche z.T. unterschiedlich gelagert. Zur Herstellung von Paraffinschnitten wurden die Gewebe in 4% Formaldehydlösung fixiert und bei 4°C gelagert. Zur Herstellung von Gefrierschnitten wurden die Gewebe im Einbettmedium *Tissue-Tag* eingebettet und bei -80°C gelagert. Für die Gewinnung von RNA und Proteinlysaten für die 2-D-Gelelektrophorese wurden die Gewebe sofort nach der Präparation in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Zur Herstellung einfacher Proteinlysate wurden die Organe in Eppendorfgefäßen auf Trockeneis gekühlt und bei -80°C gelagert.

Methoden

3.6.5 Präparation von Organlysaten

Um die Proteine in den Organen von Mäusen zu analysieren, wurden jeweils 100 mg Gewebe mit 1 ml denaturierendem SDS-Lysepuffer versetzt und mit Hilfe eines Homogenisators (Potter) zerkleinert. Das Lysat wurde anschließend 5 min. bei 95°C erhitzt und 10 sec. mit Ultraschall behandelt (5 Zyklen, 5 Pulse pro Zyklus). Die Proteine in den Lysaten konnten anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt (vergl. 3.4.2) und z.B. das 6xHis-NS5A-V5 Transgen mittels eines V5-*tag* spezifischen Antikörper durch Western Blot Analyse nachgewiesen werden (vergl. 3.5.2).

3.6.6 Bestrahlung von Mäusen

Um eine erhöhte Tumorfrequenz in Mäusen zu erzeugen und somit eine mögliche Tumorpromotor-Eigenschaft von NS5A in transgenen Mäusen zu untersuchen, wurde die Bestrahlung der Versuchstiere gewählt. Dieses Verfahren ist für die Tiere besonders stressarm. Die Tiere wurden nach dem Protokoll von (Kaizu et al., 2000) mit einer subletalen Ganzkörperdosis von 3 Gy bestrahlt. Dazu wurden die Mäuse 7 min. 30 sec. einer Cäsium¹³⁷ Quelle ausgesetzt. Um eine mögliche Tumorbildung zu detektieren, wurden die Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Bestrahlungsvorgang getötet und untersucht.

3.6.7 Histologische Methoden

Um Lebergewebe histologisch zu untersuchen, wurden verschiedene Methoden angewendet, zum einen die Anfertigung von Gefrierschnitten und zum anderen die Herstellung von Paraffinschnitten.

Gefrierschnitte (Cryoschnitte):

Mit einem Cryotom wurden Schnitte von den in dem Einbettmedium *Tissue-Tag* eingebetteten Lebergeweben angefertigt, die in der Regel 5 µm dick waren. Diese Schnitte wurden in 4% Formaldehyd fixiert und anschließend mit absolutem Alkohol, versetzt mit DAPI (1 µg/ml), behandelt. Nach Waschen mit PBS-T (0,05% Tween) und Blockieren mit 10% BSA in PBS-T wurden die Schnitte mit αV5 Antikörpern für 1 h bei RT behandelt (Antikörper in 10% BSA, PBS-T). Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T wurden die Schnitte mit einem Cy3 (roter Fluoreszenzfarbstoff) gekoppelten sekundären Antikörper für 30 min. bei RT inkubiert (2. AK in 10% BSA, PBS-T). Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden die Präparate mit PBS/Glycerol (30%) und einem Deckgläschen eingedeckelt, mit Nagellack versiegelt und am konfokalen Laserscan-Mikroskop ausgewertet.

Methoden

Paraffinpräparate

Sollten Paraffinpräparate angefertigt werden, wurden die Gewebe direkt in 4% Formaldehyd fixiert und bei 4°C gelagert. Die Anfertigung von Paraffinblöcken und der nachfolgenden histologischen Präparate wurde größtenteils von Mitarbeitern der Pathologie am UKE in Hamburg unter der Leitung von Prof. Dr. U. Schumacher durchgeführt und wird daher nur in Kürze wiedergegeben.

Die mit Formaldehyd fixierten Gewebe wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und anschließend in Paraffin eingebettet. Nach Anfertigung von Schnittpräparaten wurden diese in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Nach Durchführung der entsprechenden Färbefahren wurden die Schnitte wieder mit einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, mit Xylol behandelt und in Eukitt Eindeckelmedium mit einem Deckgläschen überschichtet und somit konserviert.

Es wurden folgende histologische Standard-Färbefahren angewendet:

- Hämatoxylin / Eosin-Färbung (H/E; Hämatoxylin: blaue Zellkernfärbung; Eosin: rote Zytosolfärbung)
- Färbung mit Periodsäure-Schiffsches Reagenz (PAS) mit Hämatoxylin-Gegenfärbung (PAS: purpurne Glycogenfärbung)

Zusätzlich wurden Lectinfärbungen angefertigt. Lectine sind Proteine nicht immunologischen Ursprungs, die an bestimmte Zuckerreste glycolisierter Zell-Oberflächenproteine binden. Die gebundenen Lectine wiederum können in histologischen Präparaten mit histochemischen und immunochemischen Methoden detektiert und sichtbar gemacht werden. Das Färbungskuster verschiedener Lectine spiegelt somit das Vorkommen bestimmter Zuckerreste auf der Oberfläche einer Zelle wider, was wiederum auf die Expression der entsprechenden Glykoproteine schließen lässt (Jorns et al., 2003). Die im Falle der Lectinfärbungen verwendeten verschiedenen Lectine sind im Ergebnissteil 4.3.4 dargestellt. Die Detektion der biotinylierten Lectine erfolgte mit an Avidin gekoppelter alkalischer Phosphatase und entsprechender Farbreaktion (Jorns et al., 2003). Die Präparate wurden zudem mit Hämatoxylin gegengefärbt.

Alle histologischen Präparate wurden am Mikroskop ausgewertet und z.T. fotografiert.

3.6.8 Genexpressionsanalyse (Transkriptom Analyse; Microarray)

Um mögliche Unterschiede in der Expression von Genen in NS5A-transgenen und nicht transgenen Mäusen auf Ebene der RNA zu erhalten (Transkriptom Analyse), wurden so

Methoden

genannte Gen-Chips in Auftrag gegeben. Diese Experimente wurden von der *Core Facility Genomics* der Universität Freiburg (<http://www.genomics.uni-freiburg.de>) durchgeführt und werden daher nur in Kürze erläutert. Prinzip der Methode ist die Herstellung markierter cDNA aus gewonnener Leber-RNA. Die Menge bestimmter cDNA ist der Menge der entsprechenden mRNA proportional. Hybridisiert man Chips, auf denen Beispielsequenzen verschiedenster Gene aufgetragen sind, mit der markierten cDNA, sollte diese an komplementäre DNA-Sequenzen auf dem Chip binden. Somit kann nach Entfernung ungebundener cDNA die Menge der gebundenen cDNA über die Signalintensität ermittelt werden und mit anderen Genen und Chips verglichen werden. Bei der Annahme eines Überschusses der jeweiligen DNA-Probe auf dem Chip ist die Menge der gebundenen cDNA proportional zur mRNA Expression des Gens.

Zum Vergleich der mRNA-Expression in NS5A-transgenen Mäusen (*founder 01*) mit Mäusen ohne NS5A wurden die Lebern von je drei Tieren nach der Präparation sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Präparate wurden zur weiteren Verarbeitung an die *Core Facility Genomics* weitergegeben. Es wurden die mRNA-Expression von 15.000 murinen Genen und deren Unterschiede statistisch ausgewertet. Betrachtet wurden nur Gene, die mindestens eine 1,5-fach unterschiedliche Expression und im t-Test mindestens eine statistische Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ aufwiesen.

Die Informationsbeschaffung zu den entsprechenden Genen erfolgte über das Internet mit den darin enthaltenen Datenbanken für Proteine und Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>; <http://expasy.org/sprot>).

3.6.9 Zweidimensionale-Gelelektrophorese (Proteomanalyse)

Um einen Überblick über mögliche Veränderungen der Proteinexpression zwischen NS5A-transgenen und nicht transgenen Mäusen zu erhalten, wurden Proteinlysate von Lebern dreier NS5A-transgener (*Founder 01*) und nicht transgener Mäuse mittels 2-dimensionaler-Gelelektrophorese (2-D-Gelelektrophorese) untersucht (Proteomanalyse). Unterschiede in der Expression der einzelnen Proteine wurden nach Silberfärbung durch den Vergleich der Gele ermittelt. Diese Analysen wurden freundlicherweise von Herrn Uwe Tessmer (Heinrich-Pette Institut, Hamburg) durchgeführt und werden daher nur kurz beschrieben.

1.Dimension

Die 2-D Gelelektrophorese ist die höchstauflösendste Proteinauftrennungsmethode. Hierbei trennt man Proteine in der ersten Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt (IP). Am IP, also dem pH-Wert, an dem sich alle Einzelladungen aufheben, ist die Nettoladung eines

Methoden

Proteins gleich null und es kann sich nicht mehr in einem angelegten elektrischen Feld bewegen. Werden Proteine in einer Matrix mit einem stationären pH-Gradienten einem elektrischen Feld ausgesetzt, so werden sie sich so lange entsprechend ihrer Nettoladung in dem Feld bewegen, bis sie zu dem pH-Wert ihres isoelektrischen Punktes gelangen.

Um die Proteine der Mäuselebern in der ersten Dimension zu trennen, wurden tiefgefrorene Leberliquots aufgetaut, 2x in PBS gewaschen und in 2-D-Lysepuffer (9 M Harnstoff, 4 % Chaps) lysiert. Zu den Lysaten wurde 0,5% Ampholytlösung (IPG-Puffer; GE-Healthcare, Schweden) des entsprechenden pH-Bereiches (pH 4-7; pH 6-9) hinzugefügt. Im Falle der Auftrennung für pH 4-7 wurden Ampholytstreifen (Immobiline Dry Strip gels; GE-Healthcare, Schweden) mit dem stationären pH-Gradienten direkt mit der Probenlösung für 16 h rehydratisiert. Im Falle des pH-Gradienten 6-9 wurden die Streifen nur mit Lysepuffer inklusive IPG-Puffer-Lösung über Nacht rehydratisiert. Danach wurden 150 µl Proteinlösung am anodischen Teil (nahe pH 6) des Streifens mit Hilfe eines *Cups* aufgetragen. Für beide pH-Bereiche wurden die Streifen für 140 kVh einem elektrischen Feld ausgesetzt (2 h 500 V, 2 h 1000V, 2 h 2000 V, Rest 8000V; Ettan IPG-Phor, GE-Healthcare, Schweden). Insgesamt wurden pro Streifen 100 µg Gesamtprotein aufgetragen. Die Lagerung der Streifen bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei -80°C.

2. Dimension

Die in der ersten Dimension getrennten Proteine wurden anschließend in der zweiten Dimension mittels SDS-PAGE (nach Laemmli; vergl. 3.4.2) ohne Verwendung eines Sammelgels nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (12,5%ige Trenngele, Größe: 26 x 20 cm, über Nacht, 120 V). Als Größenstandard wurde ein LMW-Marker verwendet (GE-Healthcare, Schweden). Eine anschließende Silberfärbung der Gele nach Heukeshoven machte Proteine einer Menge von 0,05-0,1 ng pro Bande sichtbar (Heukeshoven & Dernick, 1988).

3.6.10 LCMV-Infektion von Mäusen und Titerbestimmung

Die Untersuchungen des Einflusses von NS5A auf eine LCMV-Infektion wurden in Kooperation mit Dr. Michael Bruns (Heinrich-Pette Institut, Hamburg) durchgeführt, der für die Infektion und Virus-Titerbestimmung verantwortlich war. Daher wird die Methode nur in Kürze beschrieben. Genauere Beschreibungen der Methode sind bei (Bruns et al., 1988, Lehmann-Grube et al., 1985) nachzulesen.

Methoden

Infektion

Je 6 transgene und nicht transgene Mäuse wurden mit 10^5 infektiösen Einheiten (PFU) des Lymphozytären-Choriomeningitis des WE-Stammes intraperitoneal infiziert.

Gewinnung von Probenmaterial

Nach 6 und 12 Tagen wurden je 3 Tiere jeder Gruppe getötet und die Milz und Leber zur Titerbestimmung entnommen. Gleichzeitig wurde Vollblut entnommen, aus dem später das Serum isoliert wurde (vergl. 3.6.2). Ein Teil der Leber wurde für spätere Untersuchungen in Formaldehyd fixiert und ein anderer Teil direkt für die Herstellung von Proteinlysaten eingefroren. Die Milz und ein Großteil der Leber wurden gewogen und anschließend zur Virusgewinnung unter Zusatz von See-Sand und 3 ml Puffer gemörsert. Nach Zentrifugation wurde der virushaltige Überstand für die Titerbestimmung verwendet.

Titerbestimmung

Zur Bestimmung der LCMV-Titer wurden Mausfibroblasten-Zellen (L-Zellen) mit unverdünnter - 1:100 verdünnter (Leber), bzw. 1:10 - 1:1000 verdünnter (Milz) Viruslösung bei 37°C inkubiert und anschließend mit Methylzellulose-haltigem Medium überschichtet. Nach 4 Tagen wurden die Zellen fixiert und gefärbt. Durch die Färbung wurden Plaques sichtbar, die ausgezählt wurden. Unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren konnte die Anzahl der *plaque-forming units* pro Gramm Gewebe (PFU/g) ermittelt werden. Dabei entspricht 1 PFU gleich 10 infektiösen Einheiten im Mausmodell (MIU).