

## II. MATERIAL UND METHODEN

### II.1 MATERIAL

#### II.1.1 Zelllinien und Zellkulturmedien

TABELLE II.1  
Zelllinien, Medium, Zusätze und Zellkulturbedingung

Zelllinie	Zellart (Spezies)	Referenz	Medium/Zusätze	Temp/CO <sub>2</sub>
293T	Humane embryonale Nierenzelle	ATCC CRL-11268	D-MEM	37°C, 5%
AP61	Mosquitozelle ( <i>Aedes pseudoscutellaris</i> )	-	L15**	28°C
BHK-21	Hamsternierenzelle ( <i>Mesocricetus auratus</i> )	ATCC CCL 10	α-MEM, D-MEM	37°C, 5%
C6/36	Mosquitozelle ( <i>Aedes albopictus</i> )	ATCC CRL-1660	L15**	28°C
Hek293	Humane embryonale Nierenzelle	ATCC CRL-1573	D-MEM	37°C, 5%
HEp2	HeLa Kontaminate (humane Zervix)	CCL-23	D-MEM	37°C, 5%
Huh7	Humane Hepatomzelllinie	-	D-MEM	37°C, 5%
PK bzw. PS	Schweinenierenzelle ( <i>Sus scrofa</i> )	-	L15**	37°C
STC-1	Humane neuroendokrine Zelle	-	RPMI 1640*	37°C, 5%
SW-13	Humane Nebennierenzelle	ATCC CCL-105	α-MEM	37°C, 5%
U-937	Humane Monozyten	ATCC CRL-1593.2	RPMI 1640*	37°C, 5%
Vero B4	Affennierenzelle ( <i>Cercopithecus aethiops</i> )	ATCC CCL-81	D-MEM, RPMI 1640*	37°C, 5%
Vero E6	Affennierenzelle ( <i>Cercopithecus aethiops</i> )	ATCC CRL-1586	D-MEM*	37°C, 5%

Alle Zellen stammen aus dem Robert Koch-Institut. Die Medien enthalten alle Phenolrot, das als Säure-Indikator dient. \* 10% FKS, 1% Penizillin/Streptomycin, 1% Glutamin. \*\* 3% FKS, 1% Penizillin/Streptomycin, 1% Glutamin

#### II.1.2 Virusstämme

TABELLE II.2  
Virusstämme

Virusstamm	Beschreibung
Yellow Fever Virus 17D	Impfstamm (#142/94/1)
Yellow Fever Virus Asibi	Wildtyp (Ghana, 1927)
Yellow Fever Virus Arilvac	Fa. Wellcome
Yellow Fever Virus Brasil	Fa. Fiocruz, Brasilien
Yellow Fever Virus Dakar	Pasteur Institut in Dakar
Yellow Fever Virus Stamaril	Fa. Aventis Pasteur
Yellow Fever Virus Gambia2001	Isolat aus importiertem YFV-Fall
Yellow Fever Virus Ivory Coast1999	Isolat aus importiertem YFV-Fall
Yellow Fever Virus YEL-AVD BE-10-05	Probe von einem YEL-AVD-Fall
Yellow Fever Virus YEL-AVD DE-07-05	Probe von einem YEL-AVD-Fall
Yellow Fever Virus YEL-AVD GB-03-06	Probe von einem YEL-AVD-Fall
Yellow Fever Virus YEL-AVD ES-08-05	Probe von einem YEL-AVD-Fall
Yellow Fever Virus YEL-AVD ES-10-04	Probe von einem YEL-AVD-Fall
Yellow Fever Virus YEL-AVD ES-09-02	Probe von einem YEL-AVD-Fall

### II.1.3 cDNA-Klone, Plasmide und Bakterien

TABELLE II.3  
cDNA-Klone, Plasmide und Bakterien

cDNA-Klone, Plasmide, Medien und Bakterien	Herkunft
<i>MC1061</i>	Dr. Beate Kümmerer, BNI Hamburg [Casadaban et al., 1980]
<i>Escherichia coli</i> K12	
Accession number LMBP 472	
Genotyp: $\Delta(\text{araA-leu})7697 \text{ araD139 } \Delta(\text{codB-lac})3=\Delta\text{lac74 galK16}$ <i>galE15 mcrA0 relA1 rpsL150 spoT1 mcrB9999 hsdR2</i> $\Delta^{\text{F}}$	
Phänotyp: $\text{str}^{\text{R}} \text{r}_{\text{K}}^{-} \text{m}_{\text{K}}^{+}$ . Wachstum in LB medium bei 37°C	
<i>pMutE52</i> (YFV pACNR/FLYF-17D, mit Mutation an Stelle E52: Arg zu Gly)	Hi-Gung Bae
<i>pMutE200</i> (YFV pACNR/FLYF-17D, mit Mutation an Stelle E200: Thr zu Lys)	Hi-Gung Bae
<i>pMutE299</i> (YFV pACNR/FLYF-17D, mit Mutation an Stelle E299: Ile zu Met)	Hi-Gung Bae
<i>pYFVNS3amp</i>	Hi-Gung Bae
<i>pYFV-3UTRamp</i>	Hi-Gung Bae
<i>pPROEX HTa</i>	Dr. Beate Kümmerer, BNI Hamburg
<i>pRS1</i>	Dr. Beate Kümmerer, BNI Hamburg
YFV pACNR/FLYF-17D (im Vektor <i>pACNR1181</i> )	Dr. Beate Kümmerer, BNI Hamburg
TOPO <sup>®</sup> TA Cloning Vektor pcDNA3.1/ V5-His	Invitrogen, Karlsruhe

### II.1.4 Synthetische Oligonukleotide

TABELLE II.4  
Nukleinsäure-, Proteinstandards und Oligonukleotide

Nukleinsäure-, Proteinstandards und Oligonukleotide	Firma
100-bp Größenmarker	Sigma-Aldrich, München
1-kb Größenmarker	Invitrogen, Karlsruhe
1-kb Plus Größenmarker	Invitrogen, Karlsruhe
RNA-Größenmarker (0,24-9,5kb)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
BGHrev (5'-TAGAAGgCACAgTCgAgg-3')	Invitrogen, Karlsruhe
Random Primer (3µg/µL)	Invitrogen, Karlsruhe
T7 (5'-TAATACgACTCACTATAggg-3')	Invitrogen, Karlsruhe
MultiMark <sup>™</sup> Multi-Colored Standard (Tris-Glycine: 250, 148, 60, 42, 30, 22, 17, 6, 4 kDA)	Invitrogen, Karlsruhe

Sämtliche während der Arbeit verwendeten Primer, die von TIB MolBiol synthetisiert worden sind, sind im Kapitel III.1.1 und im Kapitel III.2.1 in Tabelle III.2 und III.9 zu finden.

## II.1.5 Antikörper

TABELLE II.5  
*Antikörper*

Antikörper	Herkunft
Flaviviridae Antiserum 4-G-2 (PAK)	
Maus Monoklonaler Antikörper (MAK) 6538	Robert Koch-Institut, Dr. M. Niedrig
Maus Monoklonaler Antikörper (MAK) 6330	Robert Koch-Institut, Dr. M. Niedrig
Rep12 (PAK)	EuroImmun, Lübeck
Goat anti-mouse-IgG (FITC-konjugiert)	Dianova, Hamburg
Horseradish peroxidase (HRP) conjugated	
Goat anti mouse IgG (H+L) (WB)	Pierce, Rockford, USA
$\alpha$ -CD3	Pharmingen, Becton, Dickinson & Co, San Jose, USA
$\alpha$ -CD4	Pharmingen, Becton, Dickinson & Co, San Jose, USA
$\alpha$ -CD19	Pharmingen, Becton, Dickinson & Co, San Jose, USA
$\alpha$ -CD28	Pharmingen, Becton, Dickinson & Co, San Jose, USA
$\alpha$ -CD45RA	Pharmingen, Becton, Dickinson & Co, San Jose, USA
$\alpha$ -CD45RO	Pharmingen, Becton, Dickinson & Co, San Jose, USA

Die Hybridomtechnologie (Köhler und Milstein, 1975) ermöglicht die Produktion großer Mengen monoklonaler Antikörper (MAK). Die Hybridome für MAK 6538 und 6330 wurden in einer Dialyse-Trommel kultiviert wie bei Jaspert et al. (1995) beschrieben. Es standen mehrere hausinterne MAK zur Verfügung, die für Neutralisationstest und passive Protektionsstudien in vivo eingesetzt wurden. Alle Antikörper sind ursprünglich mit isoliertem YFV induziert worden.

## II.1.6 Chemikalien, Medien, Puffer- und Gebrauchslösungen

Chemikalien wurden mit dem Reinheitsgrad p.A. (*pro analysi*; für analytische Zwecke) oder der höchsten verfügbaren Reinheitsstufe (reinst) verwendet. Wenn in dieser Liste nicht aufgeführt, sind die Zusammensetzungen der Lösungen bei den entsprechenden Protokollen zu finden. Alle aufgeführten Puffer und Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt. Angegebene Prozentangaben sind, falls nicht anders erwähnt, Volumenprozent.

TABELLE II.6  
*Chemikalien, Puffer- und Gebrauchslösungen*

Chemikalien, Puffer- und Gebrauchslösungen	Firma
5 x Puffer (PCR)	Invitrogen, Karlsruhe
10 x Puffer (PCR)	Invitrogen, Karlsruhe
$\alpha$ -MEM	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Agar	Invitrogen, Karlsruhe
Agarose (NuSieve® 3:1)	Biozym, Oldendorf
Ampizillin	Sigma-Aldrich, München
Antikörper-Puffer (WB): - Waschpuffer + 1 % Milchpulver (w/v)	
APES (3- Akinopropyltriethoxysilene)	Sigma-Aldrich, München
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Roth, Karlsruhe

β-ME (β-Mercaptoethanol)	Sigma-Aldrich, München
Bleicitrat	Serva, Heidelberg
Alkalisches Bleicitrat	
- 40 mg Bleicitrat	
- 0,1 ml 10 M NaOH	
- 10 ml aq bidest., frisch ausgekocht und abgekühlt	
Blockpuffer (IF)	
- 10 ml PBS	
- 3 % (v/v) FKS	
- 0,1 % (v/v) Tween 20	
Blockpuffer (WB)	
- Waschpuffer + 10 % Milchpulver (w/v)	
Bromphenolblau (Tetrabromphenolsulfonphthalein)	Sigma-Aldrich, München
0,05 M Cacodylatpuffer	
- 100 ml 0,1 M Natriumcacodylat	
- 8,3 ml 0,1 M HCl	
- ad 200 ml aq bidest.	
- pH 7,2	
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, München
CMC (Carboxymethylcellulose)	BDH Chemicals Ltd., Poole, England
Cäsiumchlorid	Roth, Karlsruhe
CsCl-Kissen	
- 5,7 M CsCl	
- 100 mM EDTA; pH 6,5	
- in DEPC-Wasser ansetzen und sterilfiltrieren	
- 6 mM β-ME hinzufügen	
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Ciprofloxacinhydrochlorid	Fagron GmbH, Barsbüttel
Coomassie Brilliant Blue R-250	Serva, Heidelberg
Coomassie-Lösung	
- 0,25g [3 mM] Coomassie Brilliant Blue R-250 in 90 ml Methanol:Wasser (1:1) lösen	
- 10 ml Eisessig zufügen	
Coomassie Plus™ Protein Assay Reagent	
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich, München
Diluent-Lösung (1 L)	
- 8 g NaCl	
- 0,4 g KCl	
- 0,06 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
- 0,06 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
- 1 g Glucose	
- 0,375 g NaHCO <sub>3</sub>	
- auf pH 7,0 einstellen	
- Zugabe von 0,2 % (v/v) Versen	
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
- 135,4 g DMEM	
- 37 g NaHCO <sub>3</sub>	
- ad 10 L aq bidest.	
- pH 7,2 mit HCl eingestellt	
- sterilfiltrieren	
DMP-30 (2,4,6-Tris(dimethylamino)-phenol)	Serva, Heidelberg
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
dNTP-Mix [10 mM]	Eppendorf, Hamburg
DTT (Dithiothreitol)[0,1 M]	Invitrogen, Karlsruhe
dUTP (2'-Desoxyuridin-5'-Triphosphat) [100 mM]	Amersham Biosciences, Freiburg
EDTA (Ethylendinitrilotetraessigsäure)	ICN, Aurora, USA
EDTA-Stammlösung (250 mM) (Ethylendiamintetraacetat)	
- 18,61 g auf 200 ml DEPC-Wasser	

- ca. 1 g NaOH-Plätzchen	
- pH 6,5 mit 1 M NaOH einstellen	
- autoklavieren	
Effectene	Qiagen, Hilden
Eindeckmedien:	
Dako <sup>®</sup> Fluorescent Mounting Medium	Dako Diagnostics, Carpinteria, CA, USA
Immu-Mount (Eindeckmedium für IFT)	Thermo Shandon, Pittsburgh, USA
Epon	Serva, Heidelberg
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Evans Blau	Euroimmun, Lübeck
FACS-Puffer	
- 18,0 g Glucose	
- 2,0 g NaN <sub>3</sub>	
- 1x PBS, pH 7,2	
- ad 1000,0 mL	
Ficoll-Paque	Amersham P.B., Freiburg
Fixier-Lösung (Silberfärbung)	
- 40 % Methanol	
- 10 % Ethanol	
- 50 % bidest. Wasser	
FKS (Fötales Kälberserum)	PAA Laboratories, Linz, A
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd-Stammlösung	
- 37 % Formaldehyd in Wasser	
Freeze-Mix (Einfriermedium)	
- 90 % (v/v) FKS	
- 10 % (v/v) DMSO (Dimethylsulfoxid)	
Gel-Beladungspuffer (10 ml)	
- 40 mg Bromphenolblau	
- 5 ml Glycin	
- gelöst in 5 ml 1x TAE oder TBE	
L-Glutamin [200 mM]	PAA Laboratories, Linz, A
Glutaraldehyd [25 %]	Serva, Heidelberg
5 % (v/v) Glutaraldehyd	
- 20 ml 25 %-iges Glutaraldehyd	
- ad 100 ml mit Hapes	
- pH 7,2	
Glycin	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
GM-CSF	Leukomax
GTC (Guanidiumthiocyanat)	Roth, Karlsruhe
GTC-Lösung (400 ml)	
- 4 M GTC	
- 1 % (w/v) Sarcosyl (N-Lauroylsarcosin)	
- 25 mM Natriumacetat; pH 6,0	
- 1 mM EDTA; pH 6,5	
- 1 M $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME)	
- Lösung in sterilem aq dest. ansetzen, auf 372 ml auffüllen	
- dazu 28 ml $\beta$ -ME erst unmittelbar vor der RNA-Präparation (unterm Abzug!) geben	
Hepes	Roth, Karlsruhe
Ionomycin	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat	Sigma-Aldrich, München

L-15 (Leibovitz)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Laufpuffer für Western Blot (5x)	
- 15 g/L Tris	
- 72 g/L Glycin	
- 5 g/L SDS	
LB Flüssigmedium	Sigma-Aldrich, München
- 10 g/l Bacto Trypton	
- 5 g/l Bacto Yeast Extract	
- 10 g/l Natriumchlorid	
- pH 7,5 (mit NaOH eingestellt)	
- nach dem Autoklavieren 100 µg/ml Ampicillin	
LB Festmedium (LB-Platten)	
- Zugabe von 1,5 % (w/v) Agar	
Laufpuffer (5-fach konzentriert) (SDS-PAGE)	
- 15 g/l Tris	
- 72 g/l Glycin	
- 3 g/l SDS	
Lipofectamine2000	Invitrogen, Karlsruhe
Medienzusätze für Zellkulturmedien	
- 10 % (v/v) FKS	
- 1 % (v/v) L-Glutamin (200 mM)	
- 1 % (v/v) Penizillin/Streptomycin-Lösung (10000 U)	
- 2 % (v/v) nicht-essenzielle Aminosäuren (nur bei DMEM)	
Mercaptoethanol-Probenpuffer (MEPP, 4-fach konzentriert)	
- 50 mM Tris, pH 6,8	
- 40 % Glycerin	
- 8 % β-ME	
- 4 g/l Bromphenol Blau	
- 80 g/l SDS	
MgCl <sub>2</sub> (Magnesiumchlorid) [50 mM]	Eppendorf, Hamburg/ Invitrogen, Karlsruhe
MEPP (Mercaptoethanol-Probenpuffer (4x)	
- 50 mM Tris; pH 6,8	
- 40% Glycerin	
- 8% β-Mercaptoethanol	
- 4 g/L Bromphenolblau	
- 80 g/L SDS	
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Trade Service Int., Zeven
M-PER (Mammalian Protein Extraction Reagent)	Pierce, Rockford, USA
Naphtalin-Black	
- 1 g Amidoschwarz	
- 13,6 g Natriumacetat	
- 60 mL Eisessig	
- ad 1.000 mL Wasser	
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, München
Natriumacetat-Stammlösung [3 M]	
- 49,22 g auf 200 ml DEPC-Wasser	
- pH 6,0 mit Essigsäure (p.A.) einstellen	
- autoklavieren	
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumsulfat	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat	Roth, Karlsruhe
Natriumthiosulfat-Stammlösung	
- 2 % Natriumthiosulfat x 5 bidest. Wasser	
NEAA (nicht-essenzielle Aminosäuren)	PAA Laboratories, Linz, A
NTP-Mix (je dNTP 10mM)	Invitrogen, Karlsruhe
Osmiumlösung 1 % (w/v)	
- 4 g OsO <sub>4</sub>	

- ad 400 ml aq bidest.	
Paraformaldehyd (PFA)	Roth, Karlsruhe
PBS-Puffer	
- 140 mM NaCl	
- 2 mM KCl	
- 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
- 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
Penizillin/Streptomycin	PAA Laboratories, Linz, A
(Roti®-) Phenol	Roth, Karlsruhe
Pioloform F-Lösung	
- 1 % (w/v) Polyvinylformal in Chloroform	Wacker Chemie, München
Polyacrylamid	Roth, Karlsruhe
Ponceau S-Lösung	Roth, Karlsruhe
- 2% Ponceau S	
- 3% Trichloressigsäure	
Ponceaurot-Lösung	
- 2 % Ponceau S in 3 %iger Trichloressigsäure	
Probenpuffer für Immunpräzipitation	
- 1% SDS	
- 100 mM DTT	
- 50 mM Tris; pH 7,5	
Probenpuffer ohne β-Mercaptoethanol (4x)	
- 50 mM Tris; pH 6,8	
- 40% Glycerin	
- 4 g/L Bromphenolblau	
- 80 g/L SDS	
Protein G Sepharose (IP)	Amersham Biosciences, Upsala, Schweden
Rinderserumalbumin (BSA)	New England BioLabs, Frankfurt a.M.
RIPA	
- 150 mM NaCl	
- 1 % Igepal CA-630	
- 0,5% Natrium Desoxycholat	
- 0,1 % SDS	
- 50 mM Tris; pH 8,0	
- 1 mM PMSF (kurz vor Gebrauch)	
ROX Referenzfarbstoff (für TaqMan®)	Invitrogen, Karlsruhe
RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Sarcosyl (N-Lauroylsarcosin)	Sigma-Aldrich, München
SDS (Natriumdodecylsulfat)	ICN Biomedicals, Aurora, OH, USA
Sea-Block Reagenz	Pierce, Rockford, USA
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
Silbernitratlösung	
- 60 mg Silbernitrat	
- 18 µl Formaldehyd (Stammlösung)	
- ad 25 ml bidest. Wasser	
S.O.C. Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Stickstoff (flüssig)	Linde, Berlin
Saccharose	Sigma-Aldrich, München
Superfect	Qiagen, Hilden
SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Luminol)	Pierce, Rockford, USA
Tannin	Mallinckrodt, St. Louis, USA
1 % (w/v) Tannin	
- 1 g Tanninsäure	
- 100 ml 0,05 M Cacodylatpuffer	
TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA)	Eppendorf, Hamburg

TBS (Tris-gepufferte Saline)	Sigma-Aldrich, München
TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin)	Roth, Karlsruhe
TPA (12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat)	Sigma, Deisenhofen
Transferpuffer (WB)	
- 25 mM Tris	
- 150 mM Glycin	
- 10 % Methanol	
Trichloressigsäure	Sigma-Aldrich, München
Tris (Trishydroxymethylendiamin)	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Trypan-Blau	Serva, Heidelberg
TSPE-Puffer	
- 10 mM Tris-HCl; pH 7,0	
- 1 % (w/v) Sarcosyl (N-Lauroylsarcosin)	
- 5 % (v/v) Phenol	
- 1 mM EDTA; pH 6,5	
- auf 10 ml mit DEPC-Wasser auffüllen und sterilfiltrieren	
Tween® 20	PAA Laboratories, Linz, A
Uranylacetat 2 % (w/v)	
- 0,20 g Uranylacetat	
- ad 10 ml aq bidest.	
- pH 4,4	
Waschpuffer (IP)	
- 50 mM Tris; pH 8	
Waschpuffer (WB)	
- 0,1 % (v/v) Tween 20 in PBS	
Wasser, Molekularbiologischer Standard	Eppendorf, Hamburg
Wasser, bidestilliertes (bidest.)	RKI
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt
Zitratpuffer (10 mM, pH 6,0)	
- 2,10 g Zitronensäure-Monohydrat	
- ad 1000 ml Aqua dest.	
- pH 6,0 mit 2 N NaOH einstellen	
Zitronensäure-Monohydrat	Roth, Karlsruhe

---



## II.1.7 Enzyme und Kits

TABELLE II.7  
*Enzyme und Kits*

Enzym / Kit	Firma
ABI PRISM <sup>®</sup> Big Dye <sup>®</sup> Terminator 3.1 Kit	Applied Biosystems, Warrington, Cheshire, UK
Benzonase <sup>®</sup>	Novagen, Madison, USA
Human IL-3-Immunoassay Kit	BioSource International Camarillo, CA, USA
Superscript III Platinum One Step Quantitative RT-PCR with ROX pcDNA3.1/ V5-His TOPO <sup>®</sup> TA Expression Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Platinum Taq-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid)	Sigma-Aldrich, München
Proteinase K	Qiagen, Hilden
QIAamp <sup>®</sup> Viral RNA Kit	Qiagen, Hilden
QIAamp <sup>®</sup> RNA Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAEX II	Qiagen, Hilden
QIAfilter Maxi Cartridge	Qiagen, Hilden
QIAGEN <sup>®</sup> Plasmid Mini/Midi/Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick <sup>®</sup> Gel-Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAshredder <sup>™</sup>	Qiagen, Hilden
QuantiTect Probe RT-PCR	Qiagen, Hilden
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla, USA
Restriktionsendonukleasen	NEB, Ipswich, USA
Dpn I	
EcoR I	
Mlu I	
Nde I	
Nsi I	
Sac I	
Xho I	
RNase A	Qiagen, Hilden
RNase-Inhibitor (RNase Out, 40U/μL))	Invitrogen, Karlsruhe/ Promega, Mannheim
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
SP6-Polymerase (15U/μL)	Invitrogen, Karlsruhe
SuperScript <sup>®</sup> II Reverse Transkriptase (200U/μL)	Invitrogen, Karlsruhe
Super Sensitive Immunodetection System	Biogenex
Peroxidase-Kit, P	
Alkaline Phosphatase-Kit, AP	
T4-DNA-Ligase	Invitrogen, Karlsruhe
TOPO-TA-Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin	PAA Laboratories, Linz, A
UDG (Uracil-DNA-Glykosylase)	Invitrogen, Karlsruhe

## II.1.8 Verbrauchsmaterialien

TABELLE II.8  
Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Firma
BioMax Film (18 x 24 cm)	Kodak, Stuttgart
DAKO Pen (PAP-Pen, Fettstift)	DakoCytomation GmbH, Hamburg
Deckelchen für TaqMan <sup>®</sup> -Platten; 8er-Streifen	ABgene, Epsom, Surrey, UK
Deckgläschen	Roth, Karlsruhe
Färbekörbe	Roth, Karlsruhe
Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Fotopapier Brovira BN; Gradation 1-5	Agfa-Gevaert, Leverkusen
Gelatinekapseln; 200 ml Volumen	Hert, München
Küvetten (Einweg-)	Eppendorf, Hamburg
Kryoboxen mit Gittersystem	Merck Eurolab, Darmstadt
Kryogefäße; 1,8 ml	Nunc, Wiesbaden
Lochplatten (24er)	Nunc, Wiesbaden
Nitrocellulosemembranen	Schleicher & Schuell, Dassel
Objektträger	Roth, Karlsruhe
Objektträger mit 8er-Lochkammern (Chamber Slides)	Nunc, Wiesbaden
Parafilm	American National Can, Greenwich, CT, USA
PCR-Platten; 96er; 0,2 ml (für TaqMan <sup>®</sup> )	ABgene, Epsom, Surrey, UK
PCR-Reaktionsgefäße: 0,2; 0,5 ml	
0,2 ml; 8er-Streifen mit Deckel	Biozym, Oldendorf/ Eppendorf, Hamburg/ Nunc, Wiesbaden
Pipettenspitzen ohne Aerosolschutz (bis 1, 10, 100, 1000 µl)	Biozym, Oldendorf
Pergaminpapier	Eppendorf, Hamburg
Petrischalen	Schleicher & Schuell, Dassel
Plattenwachs	Greiner, Frickenhausen
Polaroidfilm 667	Heko Werk, Berlin
Quadripermschalen	Polaroid, Offenbach
Reaktionsgefäße: 0,5; 1,5; 2,0 ml	Greiner Frickenhausen
15, 50 ml	Eppendorf, Hamburg
Refinal	Nunc, Wiesbaden
Scientia Planfilm 23DP3AH	Agfa-Gevaert, Leverkusen
Seropipetten (1, 2, 5, 10, 25, 50 ml)	Agfa-Gevaert, Leverkusen
Skalpelle (Einweg-)	Nunc, Wiesbaden
Spatel (diverse)	B. Braun Aesculap, Tuttlingen
Spritzen (Einweg-)	Roth, Karlsruhe
Sterilfilter (0,22 und 0,45 µm)	B. Braun, Melsungen
	Millipore, Billerica, USA, Roth, Karlsruhe; Schleicher & Schuell, Dassel
Whatman-Papier	Schleicher & Schuell, Dassel
Zellkulturflaschen mit und ohne Filterdeckel (25, 75, 175 cm <sup>3</sup> )	Nunc, Wiesbaden
Zellschaber (23 cm; 32 cm)	Nunc, Wiesbaden
Zentrifugengefäße: 14 x 95 mm PA (Polyallomer)	Beckman Coulter, Krefeld
12 x 75 mm PP (Polypropylen)	Greiner, Frickenhausen

## II.1.9 Geräte

TABELLE II.9  
Geräte

Gerät	Firma
Analysenwaage (BP 310 P)	Sartorius, Göttingen
Autoklaven	
Automat 21/2	Webeco, Bad Schwartau
Varioklav <sup>®</sup>	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Brutschränke	New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA und Heraeus, Hanau
Casy Cell Counter, Easy Count 1	Schärfe, Reutlingen
Dewar-Isoliergefäß	Roth, Karlsruhe
FACScan	Pharmingen, Becton, Dickinson & Co, San Jose, USA
Gefrierschränke.	
-20 °C	Bosch, Stuttgart/ Liebherr, Biberach a. d. Riß
-80 °C	Heraeus, Hanau
Geldokumentationsgerät	PEQLAB, Erlangen
Gelelektrophoresesysteme, horizontal	Biozym, Oldendorf / BIO-RAD, München
Glaswaren (Kolben, Flaschen usw.)	Schott Glas, Mainz
Heizplatte mit Magnetrührer	PMC-Sierra, Santa Clara, USA
Kühlschränke	Bosch, Stuttgart/ Philipp Kirsch, Offenburg
Mikroskope:	
Fluoreszenzmikroskop (Axioskop 20)	Zeiss, Jena
Invertmikroskop (Axiovert 25)	Zeiss, Jena
Konfokales Laser Scanning Mikroskop (cLSM510)	Zeiss, Jena
Lichtmikroskop (Axiophot)	Zeiss, Jena
Transmissionselektronenmikroskop (EM 10 A/B)	Zeiss, Jena
Mikrowelle	Bosch, Stuttgart
Neubauer-Zählkammer	Roth, Karlsruhe
Photometer:	
Bio-Photometer	Eppendorf, Hamburg
Mikrotiterplattenphotometer (EAR 400 AT)	SLT Laborinstruments Austria, Salzburg, A
Pinzetten (diverse)	Roth, Karlsruhe
Pipetten (Eppendorf Reference Pipetten)	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe (Accu-jet) <sup>®</sup>	Brand, Wertheim
Rotationsmischer (R1)	Pelco International, Redding, CA, USA
Rotoren:	
HB-6	Kendro, Langenselbold
SW28 (für UZF), SW40 (für UZF)	Beckman, Palo Alto, CA, USA
SS34	Sorvall
Rotor-Stator-Homogenisator-System:	
T8 basic Ultra-Turrax <sup>®</sup> ; Dispergierstation	
T8.10; Netzgerät T8.01; Dispergierwerk- zeuge: S25N-18G, S25N-8G	IKA Labortechnik, Staufen
Sequenziergerät	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Sofortbildkamera	Polaroid, Offenbach
Spannungsgeräte	Biometra, Göttingen/ Bio-Rad, München
(ABI PRISM <sup>®</sup> 3100 Genetic Analyzer)	
Speed-vac-Vakuumanlage:	Uniequip, Leipzig
Speed-vac Univapo <sup>®</sup> 150 ECH, Pumpe und Kühlfalle Unijet II <sup>®</sup>	
Sterilarbeitsbänke:	
Antair BSK	Kendro, Langenselbold

Haereus Herasafe HSP Stickstoffprobenlagerungstank Temperierbad (TER2)	Heraeus, Hanau Union Carbide, Houston, TX, USA IKA Labortechnik, Staufen / V.Recker Laborbedarf, Berlin Eppendorf, Hamburg
Thermoblock (Thermomixer comfort)	
Thermozykler:	
ABI Prism® Sequence Detector (für TaqMan®) (Typen: 7700, 7900 HT)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Biometra T Gradientencycler	Biometra, Göttingen
Biometra TRIO Thermoblock mit Heizdeckel	Biometra, Göttingen
Tiefkühlbox für TaqMan®-Platten mit Alu-Block	Nunc, Wiesbaden
Trimmgerät (TM 60)	C. Reichert, Wien, A
Ultramikrotom (Ultracut S)	C. Reichert, Wien, A
UV-Tisch (Transilluminator TC-312A)	Spectroline, Westbury, NY, USA
Vortex®	Roth, Karlsruhe
Westernblot-Apparatur (Fastblot)	Biometra, Göttingen
Zentrifugen:	
Heraeus Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau
RC 50 Plus Kühlzentrifuge	Kendro, Langenselbold
Sigma 2K15 Kühlzentrifuge	B. Braun, Melsungen
Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Ultrazentrifuge (XL-90)	Beckman, Palo Alto, CA, USA

## II.1.10 Software

TABELLE II.10  
*Software*

Software	Firma
BioEdit	North Carolina State University, USA. ( <a href="http://www.mbio_ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html">www.mbio_ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html</a> )
BLAST 2.2.9	NCBI, Bethesda, MD, USA ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/">www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/</a> )
CellQuest Version 4.0	Becton Dickinson, Heidelberg
cLSM510 Software, Version 3.0, SP3	Zeiss, Jena
GeneAmp® 5700 SDS Software	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
SDS 1.9.1 (für Typ 7700)	
SDS 2.1 (für Typ 7900 HAT)	
Lasergene 5 + 6	DNASStar Inc., Madison, WI, USA
PrimerSelect®, SeqMan® II, MapDraw®, SeqBuilder®, EditSeq®, MegAlign®	
Microsoft Office	Microsoft, Redmond, USA
Phylip (PHYLogeny Inference Package)	Open source
ProCite 5	Institute of scientific information

## II.2 METHODEN

### II.2.1 Sterilisationsverfahren, Gamma-Bestrahlung

Medien, Lösungen, Reaktions- und Kulturgefäße wurden zur Sterilisation 20 bis 25 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Reaktions- und Kulturgefäße aus Glas oder Metall wurden alternativ bei 180 °C für 4 h hitzesterilisiert werden. Hitzeempfindliche Lösungen, wie z.B. Antibiotika oder Enzymlösungen wurden sterilfiltriert.

Alle Proben, die für weitere Methoden nicht infektiös sein mussten, wurden durch Gamma-Bestrahlung inaktiviert. Dabei wurden die Proben für 12 bis 13 Stunden mit einer Dosis von 34,5 kGy bestrahlt. Als Strahlenquelle wurde hierbei Kobalt-60 verwendet. Die Proben wurden dazu an die Firma Gamma-Service Produktbestrahlung GmbH versendet.

### II.2.2 Kultivierung von Zellen

Für Infektionsstudien, Immunfluoreszenztests und Transfektionen wurden eine Suspensions- und verschiedene adhärenzte Zelllinien verwendet (siehe Tabelle II.1).

Das Auftauen der Zellen erfolgte sehr schnell im heißen Wasser auf Raumtemperatur (RT), um zellschädigende Eiskristallbildung zu vermeiden. Die Zellen wurden nach Zugabe von 10 mL Medium für 10 min bei 500xg zentrifugiert, um das zelltoxische DMSO zu entfernen. Der Überstand wurde abgegossen, das Sediment mit etwas Medium resuspendiert, in eine Zellkulturflasche überführt und im Brutschrank inkubiert (Tabelle II.1). Die verwendeten Zellen wurden vor Beginn der Versuche mittels PCR und während der Versuche mittels Immunfluoreszenz (IF) auf die intrazellulären Parasiten der Gattungen Mykoplasma und Acholeplasma (Mykoplasmen) getestet (Kap. II.2.7.9.2). Mit Mykoplasmen kontaminierte Zellen wurden mit 10 µg/mL Ciprofloxacinhydrochlorid behandelt.

Das Einfrieren der Zellen erfolgte nach Trypsinbehandlung, Sedimentierung der Zellen durch Zentrifugation bei 500xg für 10 min und Resuspendierung des Zell-Sediments mit 5 mL Freeze-Mix (DMSO/FKS 1:9). Die Zellen (je 1 mL-Aliquots) wurden langsam (-1 °C/1 h) bis -80 °C gefroren und nach einer Woche in flüssigen Stickstoff überführt.

Konfluent adhärent gewachsene Zellen wurden durch Trypsinbehandlung abgelöst und in geeigneten Verdünnungen in neue Zellkulturflaschen ausgesät und weiter passagiert. C6/36-Zellen wurden ohne Trypsin, jedoch mit einem Zellschaber in Lösung gebracht. Die gelösten Zellen wurden in Medium resuspendiert und mit dem jeweiligen Umsetzungsfaktor in neue Zellkulturflaschen umgesetzt.

Die makrophagenähnliche Zelllinie U-937 wächst als Suspensionskultur und wurde, entsprechend dem Umsetzfaktor, in eine mit frischem Medium gefüllte neue Zellkulturflasche überführt.

#### **II.2.2.1 Isolierung von peripheren mononukleären Zellen (PBMC)**

Von 17 Personen wurde vor und nach der Gelbfiebervirus (YFV)-Impfung Blut abgenommen und deren PBMCs isoliert. Nach dem Abzentrifugieren von Vollblut erhält man ein Lymphozytenkonzentrat (Buffy Coat), aus dem sich mittels Dichtegradienten-zentrifugation die PBMCs isolieren lassen. Das Lymphozytenkonzentrat wurde 1:2 mit PBS verdünnt. 15 mL Ficoll-Paque (spezifische Dichte 1,077 g/mL) wurde im 50 mL Falconröhrchen vorgelegt, das verdünnte Blut vorsichtig darübergeschichtet und dann für 30 min bei 500xg zentrifugiert. Nach der Zentrifugation waren drei Phasen erkennbar, die obere Phase enthielt Plasma, die mittlere Monozyten und Lymphozyten und die untere Phase beinhaltete vorwiegend Erythrozyten. Die PBMCs wurden vorsichtig an der Phasengrenze abgenommen, in ein neues Röhrchen (50 mL) überführt und mit PBS aufgefüllt, um die Zellen dreimal mit PBS zu waschen. Die erste Zentrifugation erfolgte für 10 min bei 450xg, die nachfolgenden Schritte erfolgten mit niedrigeren Umdrehungsgeschwindigkeiten 250xg und 170xg. Der Überstand wurde jeweils abgegossen und das letzte Sediment in 30 mL RPMI 1640-Medium (+10 % FKS) aufgenommen.

#### **II.2.2.2 Bestimmung der Zahl lebender Zellen**

Zur Bestimmung der Zahl lebender Zellen wurden diese mit Trypsin abgelöst und mit Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde 1:10 mit dem entsprechenden Medium verdünnt und mit Trypan-Blau versetzt. Dieses wird von den toten Zellen aufgenommen, so dass sich diese blau anfärben und so von den lebenden Zellen unterschieden werden können. In einem Hämocytometer

(Neubauer-Zählkammer) wurden die in vier Quadranten befindlichen nicht blau angefärbten Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt. Der Mittelwert aus den vier Quadranten wurde errechnet.

### **II.2.2.3 Stimulation der Zellen**

PBMCs aus humanem Blut wurde mittels Ficoll Dichtegradientenzentrifugation gewonnen (Kap. II.2.2.1) und in flüssigen Stickstoff bis zur Stimulierung gelagert. Für die Stimulierung wurden die PBMCs aufgetaut und in 15 mL Röhren gewaschen (mit RPMI 1640 + 10 % FKS, bei 500xg für 10 min) und auf  $10^6$  Zellen/mL eingestellt. Davon wurden 500  $\mu$ L in jede Vertiefung einer 24-Lochplatte gegeben. Die Zellen wurden mit 25 ng/mL TPA + 1  $\mu$ M Ionomycin und mit 25  $\mu$ g/mL  $\alpha$ CD3 + 12  $\mu$ g/mL  $\alpha$ -CD28 für 6 h im feuchten Brutschrank bei 37 °C stimuliert. Danach wurden die Zellen von je einer Vertiefung in je einem 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und die Zellen bei 500xg für 2 min abzentrifugiert. Der Überstand kam in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß. Das Reaktionsgefäß mit dem Zell-Sediment wurde mit RLT-Puffer (QIAamp® RNA Blood Mini Kit) versetzt und die Gesamt-RNA nach Kapitel II.2.6.2. aufgearbeitet. Mit Hilfe der Zytokin-TaqMan-PCR wurde in dieser RNA nach bestimmten Zytokinen (Kapitel II.2.7.9.6) gesucht. Die Überstände und die restliche RNA wurden zur Detektion der Viruslast von Gelbfiebereviren (YFV) weiterverwendet (Kap. II.2.7.9.4).

### **II.2.2.4 Infektion von Zellen**

Die Zellen, die für die Infektion benutzt wurden, waren zu 80-100 % konfluent gewachsen. Die Infektion der Zellen erfolgte immer nach dem gleichen Prinzip. Zuerst wurden die Zellen mittels Diluent und Trypsin oder mit einem Zellschaber von der Zellkulturflasche abgelöst und mit 10 mL Medium resuspendiert. Die Infektion der Zellen erfolgte bei einer Infektionsdosis (MOI) von 0,01 bis 1,0. 10 bis 20 % von dieser Zell-Virussuspension wurden auf Quadripermschalen, in denen Objektträger lagen, gegeben. Diese Objektträger dienten zum einen dazu, die Infektion mittels Immunfluoreszenz zu verfolgen und zum anderen um bestimmen zu können, wann der Zeitpunkt der Virusernte (80-100% infizierte Zellen) gekommen ist. Die restliche Zell-Virussuspension wurde in Zellkulturflaschen überführt und im Brutschrank (Tabelle II.1) inkubiert.

### II.2.2.5 Titration von YFV und Titerberechnung mittels Plaque Assay

Bei der Virustitration wird die Menge an infektiösen Viruspartikeln ermittelt und die infektiösen Einheiten (plaque forming unit, PFU) bestimmt. Eine für das Virus empfängliche Zelllinie wurde mit der Virussuspension in 24-Lochplatten gegeben und nach 4 h Inkubationszeit mit Überschichtungsmedium (1,6 % CMC) bedeckt. Durch die hohe Viskosität des Überschichtungsmediums wurde verhindert, dass sich die Viren durch Diffusion verteilen und so den gesamten Zellrasen lysieren. Stattdessen breitet sich die Infektion von Nachbarzelle zu Nachbarzelle aus, so dass ein sich vergrößernder Plaque entsteht. Ein Plaque entspricht hierbei einem infektiösen Viruspartikel.

Am Vortag wurde das Überschichtungsmedium angesetzt. Dazu wurde CMC im Erlenmeyerkolben autoklaviert. Danach wurde es mit L15-Medium und 3 % FKS aufgenommen und bis zum nächsten Tag unter ständigem Rühren gelöst.

24 Lochplatten wurden mit je 0,2 mL einer  $6 \times 10^5$  PS-Zellen/mL enthaltenden Suspension in Leibovitz-Medium beschickt. Von der zu prüfenden Virussuspension wurden geeignete Verdünnungsreihen hergestellt und 0,2 mL zu den Zellen in der 24-Lochplatte gegeben. Nach 4 h Inkubationszeit (feuchter Brutschrank, 37 °C) wurden 0,4 mL Überschichtungsmedium (1,6 % CMC + 3 % FKS in L-15-Medium) pro Vertiefung zugefügt. Die Platten wurden anschließend 5 Tage bei 37 °C inkubiert. Nach 5 Tagen wurde das Medium abgenommen, die adhärenen Zellen wurden mit 4 %igem Formalin (15 min) fixiert und mit Naphtalin Black (20 min) angefärbt. Auf den mitgeführten Negativ-Kontrollen wurde statt der Virussuspension Medium zugegeben. Nach der Trocknung wurden die Virusplaques bei einer gut auszuwertenden Verdünnungsstufe ausgezählt und der Virustiter nach der unten angegebenen Formel bestimmt [de Madrid und Porterfield, 1969, Porterfield, 1959]. Der Virustiter wurde angegeben in PFU/mL.

$$\text{Virustiter} = \frac{N_{\text{Plaques}}}{\text{Verd.} \times 0,2} \quad \text{PFU} / \text{mL}$$

Um Pipettierfehler und andere Fehlerquellen auszuschließen, wurden die Virustiter immer als Doppel- bzw. Vierfachbestimmungen ermittelt.

### II.2.2.6 Neutralisation im Plaquetest (für YFV)

Mit der Neutralisation im Plaquetest (NT-Test) wird die Konzentration der neutralisierenden Antikörper ermittelt. Die Probenverdünnungen werden dazu mit



einer definierten Menge Virusverdünnung gemischt und 1 h bei 37 °C inkubiert. In dieser Zeit lagern sich, wenn vorhanden, die neutralisierenden Antikörper an die entsprechenden Epitope der Viren an und verhindern später eine Infektion der Zellen. Je mehr neutralisierende Antikörper in der Verdünnungsstufe vorhanden sind, desto weniger Plaques werden später sichtbar.

Am Vortag wurde das Überschichtungsmedium angesetzt (Kap II.2.2.5). Am folgenden Tag wurden Serumverdünnungen (1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320) von der zu untersuchenden Probe und von einem Referenz-Negativ-Serum hergestellt. Je Serumverdünnung wurden 0,6 mL in ein 1,5 mL-Gefäß überführt. Dann wurde die Virusverdünnung aus der Referenzcharge 354/1 hergestellt, so dass ca. 200 PFU/mL enthalten waren. Zu jedem Röhrchen der Serumverdünnungen wurden 0,6 mL der Virusverdünnung hinzugeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. In dieser Zeit wurden die PS-Zellen mit Diluent und Trypsin abgelöst und die Zellzahl auf 450.000–600.000 Zellen/mL eingestellt. Das Serum-Virusgemisch wurde nach einer Stunde aus dem Inkubator (37 °C) genommen und zur Reaktionsunterbrechung auf Eis gestellt. 24-Lochplatten wurden mit je 0,2 mL Zellen und 0,2 mL Serum-Virusgemisch pro Reaktionseinheit beschickt. Das Zell-Serum-Virusgemisch wurde vorsichtig geschwenkt (nicht kreisend) und 4 h im feuchten Brutschrank (nahezu 100% relative Luftfeuchtigkeit) bei 37 °C inkubiert. Nach 4 h wurde 0,4 mL Überschichtungsmedium dazugeben. Nach 5 Tagen Inkubation im feuchten Brutschrank bei 37 °C (ohne CO<sub>2</sub>-Begasung) wurden die Platten für 15 min mit Formalin (4 %) fixiert und anschließend für 20 min mit Naphtalin Black gefärbt. Die Plaques wurden ausgezählt und die 90 %ige Plaquereduktion nach Spearman [1908] und Kärber [1931] berechnet.

### **II.2.3 Mikrobiologische Methoden**

#### **II.2.3.1 Anzucht von Bakterien**

Die Bakterien wurden je nach Verwendungszweck entweder unter ständigem Schütteln in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Festmedium bei 37 °C kultiviert. Die Selektion plasmidhaltiger Bakterien auf Resistenzen gegen Antibiotika wurde durch Zugabe von Ampizillin (100 µg/mL) gewährleistet.

Zur Lagerung von Bakterien über längere Zeiträume wurde das Sediment einer 5 mL Bakterienkultur (Übernachtkultur) in LB-Medium resuspendiert, mit Glycerin (20 %) versetzt und in ein thermostabiles Gefäß (1,8 mL) bei -80 °C eingefroren.

#### **II.2.3.2 Herstellung transformationskompetenter Bakterien**

*E. coli*-Zellen wurden zunächst in einer 5 mL-LB-Flüssigkultur angezchtet, um sie dann in eine 500 mL-Kultur zu überführen. Die Anzucht erfolgte bei 37 °C ca. 2,5 bis 3,5 Stunden bis eine optischen Dichte von  $A_{600} = 0,5-1$  (ca.  $8 \times 10^8$  Zellen) erreicht wurde. Die Kultur wurde 10 min auf Eis gehalten, um sie dann bei 3000xg für 10 min zu zentrifugieren. Das Zell-Sediment wurde in 1/10 Vol (50 mL) kaltem 0,1 M  $\text{CaCl}_2$  resuspendiert und für 20 min auf Eis gehalten. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 8000xg für 10 min geerntet und in 1/100 Vol (5 mL) kaltem 0,1 M  $\text{CaCl}_2$ :Glycerol (85:15) resuspendiert. Die kompetenten *E. coli*-Zellen wurden in je 50 µL und 25 µL Aliquots in Reaktionsgefäße gegeben, im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

#### **II.2.3.3 Transformation von kompetenten Bakterien**

Unter Transformation versteht man das Einbringen freier DNA in kompetente Bakterien. Pro Transformation wurden 10 µL kompetente Bakterien auf Eis für 10 min aufgetaut und mit 90 µL kaltem  $\text{CaCl}_2$  versetzt. 0,2 µg von der Plasmid-DNA wurden zu der Bakterien- $\text{CaCl}_2$ -Suspension gegeben und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeschockbehandlung der Bakterien bei 43,5 °C für 45 sek. Nach einer Abkühlung der Bakterien auf Eis für 1-2 min, wurden 200 µL LB-Medium dazugegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert, bevor die Bakterien auf ampizillinhaltige LB-Platten (100 µg/mL Ampizillin) ausplattiert und über Nacht (ÜN) bei 37 °C inkubiert wurden. Die entstandenen Kolonien wurden zum Animpfen von „Mini-Präps“ verwendet.

#### **II.2.3.4 Kleine Plasmidpräparation („Mini Präps“)**

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse [Birnboim und Doly, 1979] mit dem Plasmid Mini Kit (Qiagen). Die mit Hilfe dieser Methode gewonnene Plasmid-DNA kann für Transfektionen, Sequenzierungen oder für nachfolgende Klonierungen eingesetzt werden. Das Animpfen eines Bakterienklons erfolgte mit einer sterilen Spitze, mit der die Kolonie vorsichtig von der LB-Platte abgestrichen und dann in ein Röhrchen, das 5 mL LB-Amp+-Medium (LB-Medium + 100 µg/mL Ampizillin) enthält, überführt wurde. Diese Kultur wurde ÜN bei 37 °C geschüttelt. 1,5 mL dieser 5 mL-Kultur wurden für 5 min bei 3000xg abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 100 µL 4 °C-kaltem Puffer P1 resuspendiert. Anschließend wurde 100 µL Puffer P2 dazugegeben, vorsichtig geschwenkt und für maximal 5 min bei RT stehengelassen. Die Neutralisation erfolgte mit 4 °C-kaltem Puffer P3 für 10 min auf Eis, bevor für 10 min bei 4 °C und bei 15.000xg das Sedimentieren der Proteine sowie der chromosomalen DNA erfolgte. Der plasmidhaltige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid-DNA mit 200 µL Ethanol (96 %) gefällt (5 min bei RT). Die Plasmid-DNA wurde für 15 min bei RT abzentrifugiert, einmal mit Ethanol (70 %) gewaschen, getrocknet und anschließend in einem angemessenen Volumen Wasser (high-copy Plasmid: 50 µL; low-copy Plasmid 30 µL) aufgenommen.

#### **II.2.3.5 Große Plasmidpräparation („Maxi Präps“)**

Um größere Mengen spezifischer Plasmid-DNA zu gewinnen, wurde das Plasmid Maxi Kit (Qiagen) verwendet. Für diese Aufreinigung wurden je nachdem ob es sich um „high-copy“- oder um „low-copy“-Plasmide handelte, 100 bis 500 mL ampizillinhaltiges LB-Medium mit 1/500 bis 1/1000 Vol von einer 5 mL-ÜN-Kultur inokuliert und ÜN bei 37 °C in einem Bakterienschüttler inkubiert. Danach wurde die Bakteriensuspension in die Zentrifuge überführt und für 10 min bei 6.000xg und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterien-Sediment in 10 mL Puffer P1/RNaseA resuspendiert. Daraufhin wurde 10 mL P2 dazugegeben und die Lösung vorsichtig gemischt. Die alkalische Lyse erfolgte 5 min bei RT. Die Neutralisierung erfolgte durch Zugabe von 10 mL Puffer P3, verbunden mit einer Inkubation der Lösung für 20 min auf Eis. Das Abzentrifugieren der Zelltrümmer, Proteine und der chromosomalen DNA erfolgte bei 20.000xg für 30 min bei 4 °C (alternativ wurde die Klärung auch mit dem

QIAfilter Maxi Cartridge durchgeführt). In der Zwischenzeit wurden die QIAGEN-tip-500 Säulen mit jeweils 10 mL QBT-Puffer äquibriert. Der Überstand aus der Zentrifugation wurde auf die Säulen gegeben. Die an die Säulenmatrix gebundene Plasmid-DNA wurde zweimal mit jeweils 30 mL QC-Puffer gewaschen und schließlich mit 15 mL QF-Puffer eluiert. Die Präzipitation der Plasmid-DNA erfolgte durch Zugabe von 10,5 mL Isopropanol und durch eine weitere Zentrifugation von 30 min bei 15.000xg und 4 °C. Die Plasmid-DNA wurde sedimentiert, einmal mit 5 mL 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und anschließend in 200 µL TE-Puffer oder Wasser resuspendiert. Die Messung der Konzentration erfolgte photometrisch und die Plasmid-DNA wurde auf eine Konzentration von 1 µg/µL eingestellt.

## II.2.4 Proteinbiochemische Methoden

### II.2.4.1 Isolierung von Proteinen aus eukaryotischen Zellen

Methode 1:

Aus einer 75 oder 175 cm<sup>3</sup>-Flasche wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Dann wurden 1,5 bzw. 3,5 mL RIPA-Puffer (+ PMSF) hinzugefügt, die Zellen für 10 min auf Eis inkubiert unter Schütteln abgelöst, anschließend resuspendiert und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß bzw. 15 mL-Röhrchen überführt, um sie dann bei 4 °C für 10 min bei 12.000xg zu zentrifugieren. Waren die Zellen nach einer Infektion bereits abgelöst, so wurden sie im eigenen Medium zentrifugiert und anschließend das Sediment zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen.

Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und bei -20 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Methode 2:

Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen 2 bis 3 Mal mit eiskaltem PBS gewaschen. 10 mL PBS wurde hinzugefügt und die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst. Nach Resuspension wurden die Zellen in 15 mL-Röhrchen überführt um sie für 5 min bei 1.000xg bei 4 °C zu zentrifugieren. Der Überstand wurde verworfen. Das Sediment wurde in 750 µL Lysispuffer M-PER (Mammalian Protein Extraction Reagent) aufgenommen und mit 0,01 Vol Proteinase-Inhibitoren und 0,5 µL Benzonase<sup>®</sup> (entspricht 12,5 Unit), einer Nuklease, die gleichzeitig die Viskosität der Lösung reduziert, versetzt. Ohne zu mischen, wurde nun für 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellreste und die DNA bei 18.300xg und 4 °C für 30 min durch Zentrifugation entfernt. Der Überstand wurde abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### II.2.4.2 Messung der Proteinkonzentration

Die Messung der Konzentration von Proteinen erfolgte mit Hilfe des Coomassie Plus<sup>™</sup> Protein Assay Reagent, welches auf dem Prinzip des Bradford-Assays [Bradford, 1976] beruht. Hauptbestandteil ist hierbei das Coomassie-Brillantblau G 250, ein Farbstoff, der unspezifisch an kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten bindet. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum

dieses Farbstoffes von 465 nm zu 595 nm. Zunächst musste eine Standardkurve erstellt werden. Dies geschah mit Hilfe verschiedener Verdünnungen einer bekannten Stammlösung von BSA (31,25-1000 µg/mL), mit deren Hilfe die verschiedenen Standardkonzentrationen direkt im Photometer gemessen und die entsprechenden Extinktionswerte gespeichert werden konnten. Es wurden 12,5 µL der zu messenden Probe und 375 µL Coomassie Plus<sup>TM</sup> Reagenz in ein Reaktionsgefäß gegeben und gut gemischt. Dann wurde für 10 min bei RT inkubiert. Die Konzentration wurde schließlich über die Absorption der Probe bei 595 nm im Vergleich zur Standardkurve bestimmt.

#### **II.2.4.3 Dotblot**

Der indirekte Immuno-Dot Blot dient dem schnellen, einfachen und trotzdem sensitiven Proteinnachweis [Schill und Arvidsson, 1989].

Die Proben wurden zuerst auf einer Nitrozellulose-Membran aufgetropft (4 x 2,5 µL, zwischendurch getrocknet). Dann wurde die Membran kurz in PBS/0,1 % Tween gewaschen, mit PBS/0,1 % Tween/5 % Milchpulver für eine Stunde die unspezifischen Bindungen abgesättigt und dann wieder kurz in PBS/0,1 % Tween gewaschen. Anschließend wurde mit dem ersten monoklonalen Antikörper MAK (6330 oder 6538) für eine Stunde bei RT inkubiert (Verdünnung: 1:500) und kurz mit PBS/0,1 % Tween gewaschen, bevor der zweite Antikörper (HRP-gekoppelter monoklonaler Anti-Maus-AK, Endverdünnung: 1:20.000) für eine Stunde bei RT inkubiert wurde. Es wurde dreimal für jeweils 5 min mit PBS/0,1 % Tween gewaschen. Je nach Membrangröße wurde die Substratlösung (SuperSignal<sup>®</sup> West Dura Chemiluminescent Substrat) frisch angesetzt und für 1-5 min bei RT inkubiert. Ein letztes Mal wurde kurz in PBS/0,1 % Tween gewaschen, die Membran in dünner Plastikfolie eingeschweißt und in einer Fotokassette gelegt. Die Peroxidase setzt das Substrat um, wobei Photonen einer Wellenlänge von ca. 415 nm emittiert werden. Diese färben den lichtsensitiven Film dunkel. Im Dunkeln bzw. unter Rotlicht wurde für 1 bis 5 min ein Film aufgelegt. Danach erfolgte die Entwicklung des Films.

#### **II.2.4.4 Immunopräzipitation**

Die Protein G Sepharose wurde zuerst vorbereitet, indem sie 3x mit Lysispuffer gewaschen, zwischendurch für 20 sek bei 12.000xg zentrifugiert und der

Überstand abgeschüttet wurde. Nun wurde eine 50 %ige Suspension hergestellt, in dem jeweils das gleiche Volumen Protein G mit Lysispuffer vermischt wurde. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C, vor Gebrauch wurde gut gemischt. Es erfolgte dann ein Vorreinigungsschritt. Dazu wurden 50 bis 100 µL der vorbereiteten Protein G-Suspension zu 1 mL Zelllysat (gewonnen nach KAP. II.2.4.1) gegeben und für 1 h bei 4 °C vorsichtig gemischt. Anschließend wurde für 20 sek bei 12.000xg zentrifugiert und der Überstand weiterverarbeitet. Zunächst erfolgte die Antigen (AG) – Antikörper (AK) - Kopplung. Dazu wurde die Probe in ein neues Reaktionsgefäß aliquotiert (500 µL) und der AK dazugegeben (1 bis 5 µg) und für 1 h bei 4°C vorsichtig gemischt. 50 µL Protein G Sepharose wurde zugeben und für 1 h bei 4 °C vorsichtig gemischt und danach bei 12.000xg für 20 sek zentrifugiert. Das Sediment wurde dreimal mit Lysispuffer und einmal mit Waschpuffer gewaschen, dazwischen je 20 sek bei 12.000xg zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen, ohne die „beads“ zu verlieren. Das Sediment wurde in 30 µL Probenpuffer für 3 min auf 95 °C erwärmt und bei 12.000xg für 20 sek zentrifugiert, um die „beads“ zu entfernen. Dann wurde 1 µL 0,1 %iges Bromphenolblau zugeben und der Überstand mittels einer SDS-PAGE (Kapitel II.2.4.5.1) analysiert.

#### **II.2.4.5 Westernblot**

Eine Identifizierung und/oder Quantifizierung spezifischer Proteine innerhalb eines Proteingemisches erfolgt mit Hilfe des Westernblots. Dies beinhaltet drei Schritte: die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine, der Transfer der Proteine aus einem Trenngel auf eine geeignete Trägermembran (Blotten) und die Proteindetektion.

##### **II.2.4.5.1 Die Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE**

In der SDS-PAGE werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch durch eine Polyacrylamidmatrix aufgetrennt [Lämmli, 1970]. SDS ist ein anionisches Detergenz, das Proteine denaturiert und deren Eigenladung effektiv überdeckt, so dass Proteine mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit entstehen (1,4 g SDS/1 g Protein in 1 % SDS-Lösung). Dieser Effekt wird durch ein Aufkochen der Probe verstärkt. Zusätzlich

können noch durch Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol die Disulfidbrücken aufgespalten werden.

Mittels SDS-PAGE/Westernblot soll das E-Protein von YFV detektiert werden. Das E-Protein ist ca. 50-60 kDa groß. Um eine möglichst gute Auftrennung in diesem Bereich zu gewährleisten, wurde ein 12 %iges Acrylamid Trenngel, mit 0,1 % SDS verwendet (Tabelle II.11).

Über dem Trenngel wurde ein Sammelgel platziert (diskontinuierliche Gelelektrophorese nach Lämmli, 1970), wodurch die Proteine an der Grenzschicht zwischen Sammel- und Trenngel zu einer scharfen Bande fokussiert werden, bevor sie in das eigentliche Trenngel einwandern. Dies ermöglicht eine gute Auftrennung und eine hohe Schärfe der Proteinbanden, was für eine gute Bestimmung der Größe wichtig ist.

TABELLE II.11:  
*Zusammensetzung eines 12 %igen Polyacrylamidgels*

	<u>Trenngel (12 %)</u>		<u>Sammelgel (5 %)</u>
H <sub>2</sub> O bidest	3,76 mL	H <sub>2</sub> O bidest	3,50 mL
2 M Tris (pH 8,8)	2,10 mL	0,5M Tris (pH 6,8)	1,00 mL
20 % SDS	50,00 $\mu$ L	20 % SDS	37,50 $\mu$ L
PAA (37 %)	3,96 mL	PAA	1,25 mL
		60 % Sucrose	1,75 mL
APS (10 %)	120,00 $\mu$ L	APS (10 %)	100,00 $\mu$ L
TEMED	15,00 $\mu$ L	TEMED	10,00 $\mu$ L

Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proteine zur vollständigen Denaturierung mit 4-fachem MEPP gemischt (Endkonz. einfach) und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 200 V bis der im MEPP enthaltene Farbstoff (Bromphenolblau) unten aus dem Gel ausgelaufen war. Von einem Proteinstandard (MultiMark™ Multi-Colored Standard) wurden 5  $\mu$ L aufgetragen. Danach wurde das Gel in PBS + 0,1 % Tween® aufbewahrt und anschließend im Westernblot oder mit der Silberfärbung weiter analysiert.

#### **II.2.4.5.2 Die Auftrennung der Proteine mittels nativer Gelelektrophorese**

Die denaturierende Wirkung von SDS auf Proteine kann dazu führen, dass der Nachweisantikörper das Epitop des Antigens nicht mehr erkennen kann. Daher wurde das SDS bei dieser Methode weggelassen.



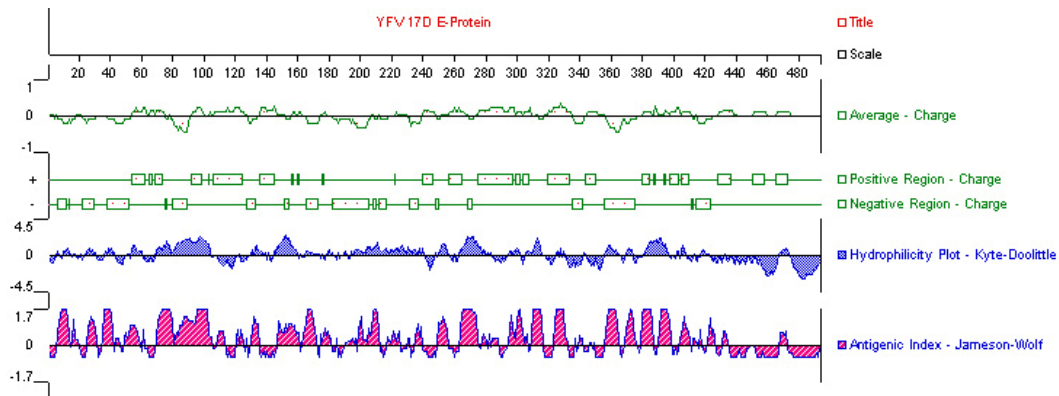


Abbildung II.1: Das YFV E-Protein und seine Ladungs- und Antigeneigenschaften.

Die Ladung der Proteine richtet sich hierbei nach ihrem isoelektrischen Punkt und dem pH-Wert des verwendeten Puffersystems. Das E-Protein liegt glykosyliert in der Virushülle vor und lässt sich in drei Domänen unterteilen (I-III). Es ist ein typisches virales Fusionsprotein der Klasse II und hat einen theoretischen isoelektrischen Punkt von 6,25. Die Anzahl negativer Ladungen zu positiver Ladungen ist annähernd gleich (51:46, Abbildung II.1).

TABELLE II.12:  
*Zusammensetzung eines nativen 12 %igen Polyacrylamidgels*

	<u>Trenngel (12 %)</u>		<u>Sammelgel (5 %)</u>
H <sub>2</sub> O bidest	3,76 mL	H <sub>2</sub> O bidest	3,50 mL
2 M Tris (pH 8,8)	2,10 mL	0,5M Tris (pH 6,8)	1,00 mL
PAA	3,96 mL	PAA	1,25 mL
		60 % Sucrose	1,75 mL
APS (10 %)	120,00 µL	APS (10 %)	100,00 µL
TEMED	15,00 µL	TEMED	10,00 µL

### II.2.4.5.3 Der Transfer der Proteine auf eine Membran (Blotten)

Nach der Auftrennung der Proteine im Gel mittels SDS-PAGE bzw. Nativer PAGE wurden die Proteine in einer Semi-Dry-Blottingapparatur auf einen Träger (hier Nitrozellulose-Membran, Porengröße 0,2 bzw. 0,45 µm) übertragen und dort immobilisiert. Dazu wurden zunächst Filterpapier (Whatman-Paper), Membran und Gel für 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Es erfolgte nun die Schichtung in folgender Reihenfolge: Kathode, Filterpapier, Gel, Nitrozellulosemembran, Filterpapier und Anode. Nun wurde eine Stromstärke von 200 mA (2 bis 4 mA/cm<sup>2</sup> Membran) für ca. 2 h angelegt. Die Spannung sollte dabei 35 V nicht überschreiten. Aufgrund der negativen Ladung der Proteine durch das SDS erfolgte nun der Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran. Nach dem Transfer wurde der Blot abgebaut und das Gel anschließend mit Coomassie-Blue

gefärbt, um die noch darin enthaltenen Proteine direkt anzufärben, und um eine erste Kontrolle über den stattgefundenen Transfer zu erhalten. Als weitere Kontrolle wurde die Nitrozellulosemembran für 2 min in Ponceaurot-Lösung gefärbt, womit die auf der Membran befindlichen Proteine reversibel angefärbt werden konnten. Die Entfärbung erfolgte mit 0,1 M Natronlauge. Die Membran wurde zwischen allen Schritten in PBS plus 0,1 % Tween<sup>®</sup> gelagert.

Um unspezifische Bindungen abzusättigen wurde die Membran ÜN bei 4 °C (oder mindestens 1 h bei RT) in Blockpuffer inkubiert. Am nächsten Tag konnte die Membran weiterverarbeitet oder zwischen zwei Filterpapieren liegend eingefroren werden.

#### **II.2.4.5.4 Die Proteindetektion**

Die Membran wurde bei 4 °C ÜN mit dem primären Antikörper (MAK 6330, 6538) inkubiert. Anschließend wurde sie dreimal für je 5 min in Waschpuffer gewaschen und danach mit dem Meerrettich-Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper (1:20.000 verdünnt) für 1 h inkubiert. Die Antikörper wurden in Antikörper-Puffer verdünnt. Schließlich wurde die Membran dreimal für je 10 min in Waschpuffer gewaschen und anschließend 5 min mit SuperSignal<sup>®</sup> West Dura Chemiluminescent Substrat inkubiert. Der Blot wurde anschließend in einer Folie eingeschweißt und in eine Fotokassette befestigt. Unter Rotlicht wurde für 1 bis 10 min ein Film aufgelegt. Danach erfolgte die Entwicklung.

Um die ideale Verdünnung des primären Antikörpers herauszufinden, wurde isoliertes Gesamtprotein in einer SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Membran wurde dann in Streifen geschnitten und die Streifen wurden mit unterschiedlichen Verdünnungen des primären Antikörpers wie bereits beschrieben inkubiert und weiterverarbeitet.

#### **II.2.4.5 Silberfärbung von Protein-Gelen**

Das Prinzip der Silberfärbung beruht darauf, dass die Silber-Ionen aus einer Silbernitratlösung, in die die Gele eingelegt werden, an die Proteine im Gel binden und durch Reduktion in Silberkeime umgewandelt werden, was durch die funktionellen Gruppen und die Peptidbindungen initiiert wurde. Durch starke Reduktionsmittel werden alle Silber-Ionen im Gel zu metallischem Silber

reduziert. Da dies in der Nähe der Silberkeime viel schneller stattfindet als im Rest des Gels, färben sich die Proteinbanden dunkelbraun.

Proteine in SDS-Gelen wurden zur Silberfärbung zunächst für 20 min fixiert (25 mL Fixierlösung + 12,5 µL Formaldehyd) und danach dreimal für je 5 min in 50 %igem Ethanol gewaschen. Danach wurde für 1 min in 25 mL Wasser mit 25 µL Natriumthiosulfat inkubiert, um durch Reduktion oben genannte Silberkeime zu bilden. Nach drei Waschschritten in Wasser für je 20 sek erfolgte eine Inkubation in Silbernitratlösung für 20 min, welcher Formaldehyd als starkes Reduktionsmittel beigefügt wurde. Nun wurde wiederum zweimal für je 20 sek in Wasser gewaschen. Das Gel wurde dann in Entwicklerlösung eingelegt. Die Inkubation erfolgte solange bis Banden sichtbar wurden. Danach wurde schnell zweimal für je 20 sek in Wasser gewaschen. Zum Stoppen der Reaktion wurde schließlich Fixierlösung auf das Gel gegeben. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe eines Geldokumentationsgerätes.

#### **II.2.4.6 Humaner IL-3 (hIL-3) ELISA**

Die quantitative Bestimmung von hIL-3 im menschlichen Serum erfolgte mittels „capture ELISA“ mit dem Human IL-3-Immunoassay Kit *in vitro*. Hierbei ist die Mikrotiterplatte mit einem monoklonalen Antikörper spezifisch gegen hIL-3 beschichtet, so dass hIL-3-haltige Proben erkannt werden können. Alle Inkubationsschritte erfolgten bei RT. 100 µL der Probe wurden für inkubiert. Im ersten Inkubationsschritt bindet vorhandenes hIL-3 am immobilisiertem („capture“) Antikörper. Danach wurde die Platte viermal mit 400 µL Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde mit 100 µL des biotinylierten Antikörpers, der spezifisch an dem vom ersten Antikörper gefangenen hIL-3 bindet, für 1 h inkubiert und danach wieder viermal gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe von 100 µL Streptavidin-HRP, das an den biotinylierten Antikörper bindet, mit einer Inkubationszeit von 30 min. Nach viermaligem Waschen wurden 100 µL der stabilisierten Chromogenlösung für 30 min im Dunkeln inkubiert, um sie dann mit 100 µL Stopp-Lösung zu versetzen und die Signale bei 450 nm in einem ELISA-Reader zu messen. Die Intensität des farblichen Produkts ist direkt proportional zu der hIL-3-Konzentration der Probe.

### II.2.4.7 Humaner Zytokin Antikörper Array

Dieser Zytokin Antikörper Array detektiert gleichzeitig mehrere humane Zytokine und ist so gegenüber den herkömmlichen ELISA-Tests im Vorteil. Dies gilt auch bezüglich der Sensitivität und des Detektionsbereichs. Die Array Membran wurde eingangs mit 1x Block-Puffer für 30 min bei RT inkubiert. Alle Inkubations- und Waschschrte erfolgten unter ständigem Schwenken. Das zu untersuchende Serum wurde 1:10 in 1x Blockpuffer verdünnt zu der Membran gegeben und ÜN bei 4 °C inkubiert. Danach wurde die Membran erst dreimal mit 1x Waschpuffer I, dann zweimal mit 1x Waschpuffer II für je 5 min mit 2 mL des jeweiligen Waschpuffers bei RT gewaschen. 1 mL der mit Blockpuffer verdünnten Biotin-konjugierten Antikörper wurde dazugegeben und für 1 bis 2 h bei RT inkubiert. Dann wurde wieder, wie oben beschrieben gewaschen. 2 mL einer 1000-fach verdünnten HRP-konjugiertem Streptavidin Lösung wurde zu der Membran gegeben und für 2 h bei RT inkubiert. Es folgen die bereits oben beschriebenen Waschschrte. Zur Detektion wurden Detektions-Puffer C und D 1:1 gemischt (je 250 µL) und für 2 min auf die Membran gegeben. Die Detektions-Puffer wurden abgegossen und die Signale mit einem lichtsensitiven Film detektiert (Belichtungszeit 40 sek bis 2 min). Dabei wurde die Membran in einer Folie eingeschweißt und in eine Fotokassette befestigt. Unter Rotlicht wurde für 30 sek bis 5 min ein Film aufgelegt. Danach erfolgte die Entwicklung.

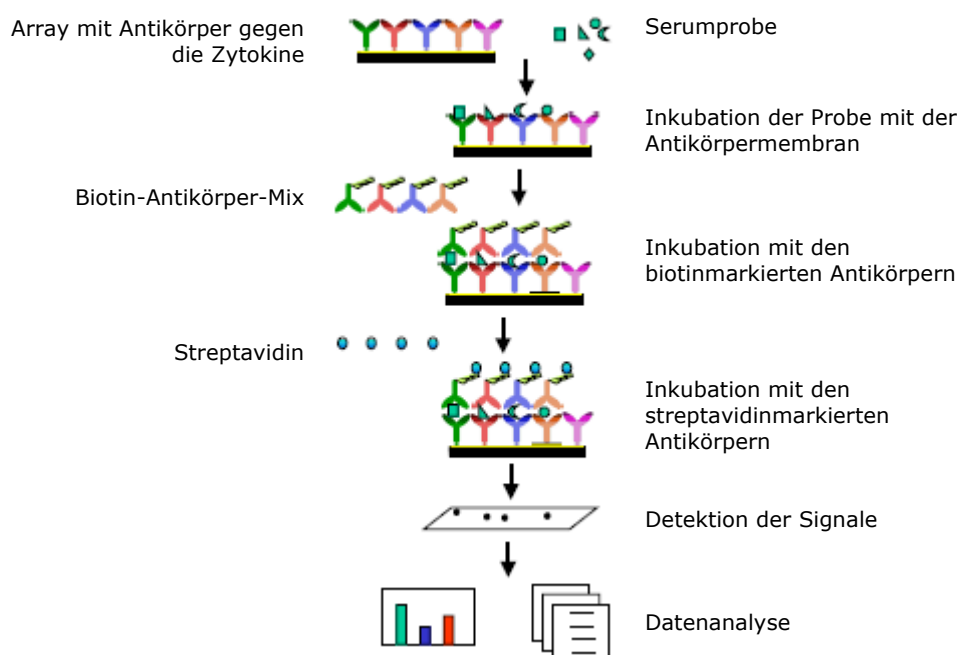


Abbildung II.2: Schema des humanen Zytokin Antikörper Array (nach Raybiotech).

## II.2.5. Mikroskopische Methoden

### II.2.5.1 Immunfluoreszenz, konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Der Nachweis viraler Antigene in der Zelle wird unter anderem durch fluoreszenzmikroskopische Methoden ermöglicht. Die Präsenz von Virusantigen auf oder in der Zelle wurde durch spezifische, an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelte Antikörper nachgewiesen [Lobigs et al., 1987].

Nachdem die *in vitro* infizierten Zellkulturen auf dem Objektträger mit Aceton fixiert wurden, wurden die Zellen mit einem  $\alpha$ -YFV-spezifischen Antikörper (primärer MAK 6538, 6330, 1:500 in PBS) für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurde dreimal für je 5 min in PBS gewaschen. Anschließend wurde einmal kurz in Aqua bidest. gewaschen und luftgetrocknet. Es erfolgte eine Behandlung mit einem sekundären Antikörper, an dem Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) ( $\alpha$ -mouse IgG-Lösung, Konjugat gekoppelt mit FITC: IgG/FITC 1:20) gebunden ist [Coons und Kaplan, 1950]. Anschließend wurde dreimal in PBS je 10 min und einmal kurz mit Aqua bidest. gewaschen. Bevor mikroskopiert wurde, wurden die Präparate luftgetrocknet und mit Eindeckmedium behandelt. Die Analyse erfolgte mit einem Zeiss cLSM 510. FITC wird bei 492 nm angeregt und hat ein Emissionsmaximum bei 520 nm.

Es werden mittels IF jedoch nicht nur die YFV-Antigene detektiert, sondern auch überprüft, ob während der Infektion Mykoplasmenkontaminationen stattgefunden haben. Dazu wurde das Rep12-Serum (1:10 und 1:100) benutzt. Alle weiteren Schritte entsprachen dem der YFV-Antigen-Detektion.

### II.2.5.2 Immunohistologie von Gewebeschnitten

Die entnommenen Gewebe der Gelbfieberfälle wurden in gepuffertem Formalin (4 %, AFIP-Grade) fixiert und nach gelbfieberspezifischem Antigen immunhistologisch in der Charité (Institut für Pathologie) untersucht. Dazu wurde ein spezifischer Antikörper (Maus MAK 6330, IgG, 5,5 mg/mL in PBS, stabilisiert mit 1 % Albumin) und ein polyklonaler (Flaviviridae Antiserum 4-G-2) benutzt. Sie wurden 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 und 1:500 in TBS verdünnt eingesetzt.

Schnitte von paraffineingebettetem Autopsiematerial (Leber, Herz, Milz, Lunge und Niere) wurden auf mit APES beschichtete Objektträger gezogen. Zur

Entparaffinisierung wurden die Präparate in Färbekörbe eingesetzt, mindestens 20 min in Xylol und anschließend in einer absteigenden Alkohol-Konzentrationsreihe (96 %, 80 %, 70 %, 50 % für jeweils 3 bis 4 min) gewaschen, um das Xylol und das darin gelöste Paraffin zu entfernen. Danach wurde in Aqua bidest. rehydriert und nachfolgend in TBS-Puffer der pH-Wert äquilibriert. Zur Antigen-Demaskierung wurden die Proben im Schnellkochtopf mit Zitratpuffer (bei pH 6,0) für ca. 5 min gekocht, zum Abkühlen dann ins Wasserbad gestellt. Anschließend wurden die Schnitte für 10 min in 3 %ige Wasserstoffperoxid-Lösung getaucht, um die endogene Gewebseroxidase in den Schnitten zu inaktivieren. Danach wurden die Objektträger erneut in Aqua bidest. und TBS Puffer für 10 min gewaschen, um das Wasserstoffperoxid zu entfernen und den pH-Wert erneut zu äquilibrieren. Die Flüssigkeit wurde vorsichtig abgetropft und die Objektträger auf Filterpapier geblottet. Die Schnitte wurden danach aus den Färbe-Körben entnommen und nebeneinander auf eine Platte gelegt. Mit einem Fettstift (DAKO Pen) wurden die Schnitte umfahren, damit die folgenden Lösungen sich nur auf dem Präparat verteilen (hydrophobe Abgrenzung) und sich nicht auf dem gesamten Objektträger verbreiten. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden 2 bis 3 Tropfen unverdünntes Sea-Block Reagenz (Pierce) auf die Schnitte getropft und 10 min inkubiert und anschließend dekantiert. Der erste Antikörper wurde bei 20 °C für 2 h in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurde mit TBS Puffer gewaschen und es wurde der sekundäre Antikörper dazugegeben (1:500) und für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurde erneut dreimal mit TBS gewaschen. Zur Detektion der gebundenen Antikörper wurde mit Super Sensitive Immunodetection System (Peroxidase-Kit, P oder Alkaline Phosphatase-Kit, AP; Biogenex) nach Herstellerangaben detektiert und Hämatoxylin als Gegenfarbstoff verwendet. Insektenzellen (C6/36), infiziert mit YFV (aus Patientenmaterial) dienen als Positivkontrolle. Die Insektenzellen wurden in 3 % (w/v) Agarose (niedrigschmelzend) und anschließend in Paraffin eingebettet und behandelt wie oben beschrieben. Als negative Kontrollen dienen zum einen nichtinfizierte Zellen und zum anderen wurde bei Kontrollpräparaten nur der sekundäre Antikörper eingesetzt bzw. unspezifische, nicht-bindende Antikörper der jeweiligen Spezies verwandt. Die Auswertung der Färbungen erfolgte lichtmikroskopisch.

### II.2.5.3 Elektronenmikroskopie

Für den direkten Erreger-Nachweis ist das Elektronenmikroskop (EM) ein geeignetes Instrument, abhängig von der Konzentration des Erregers. Es ist eine apparativ aufwendige Methode mit einer relativ geringen Empfindlichkeit (Nachweisgrenze ca.  $10^6$  Partikel/mL). Sie eignet sich aber bei partikelreichen Proben für die EM-Diagnostik. Biologische Proben müssen aufgrund des geringen Eigenkontrasts zusätzlich kontrastiert werden, um die notwendigen Strukturdetails erkennen zu können. Dabei bedient man sich u.a. der Negativ-Kontrastierung, bei der die Probe mit einer amorphen, die Elektronen stark streuenden Substanz (Schwermetallsalze, z.B. Uran, Blei, Osmium, Wolfram u.ä.) versetzt wird. Drei grundsätzliche Präparationsmethoden liefern für die Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) geeignete dünne und elektronendichte Schichten: die Negativ-Kontrastierung mit Schwermetallsalzen, die Darstellung von Ultradünnschnitten im Positiv-Kontrast und die Bedampfung mit Schwermetall (z. B. Platin, Chrom) [Gollins und Porterfiled, 1985, Gelderblom et al., 1985]. In dieser Arbeit bleibt Letzteres unberücksichtigt.

#### II.2.5.3.1 Reinigung, Befilmen und Stabilisieren der Trägernetze

Vor der Befilmung müssen die Trägernetze (Grids) gereinigt wurden, dafür wurden sie für 1 bis 2 min in Eisessig mit Ultraschall behandelt und danach gründlich mit Aqua bidest. gespült und getrocknet.

Zur elektronenmikroskopischen Untersuchung wurden Partikelsuspensionen auf Trägernetze (Grids), die mit Pioloform F befilmt sind, aufgebracht. Vor der Befilmung wurde ein Glasobjektträger kurz mit Ethanol gereinigt und getrocknet. Dieser wurde dann mit 0,6 % Pioloform F (in Chloroform) beschichtet, so dass auf dem Objektträger ein homogener Pioloformfilm aufliegt. Nach kurzer Trocknung wurde die Pioloform-Beschichtung auf eine saubere Wasseroberfläche abflottiert. Auf den Film wurden nun die Grids mit der dunkel-glänzenden Seite nach unten gelegt. Der belegte Film wurde vorsichtig mit einem Stück Filterpapier von der Wasseroberfläche abgenommen und an der Luft getrocknet.

Zur thermischen und mechanischen Stabilisierung wurden die Filme in einer Aufdampfanlage bei einem Vakuum  $<133 \times 10^{-5}$  Pa ( $10^{-5}$  Torr) durch Widerstandsverdampfung mit einem 4 bis 5 nm dünnen Kohlefilm verstärkt.

Zur Verbesserung der Adsorptionseigenschaften wurden die Grids ca. 1 h vor dem Auftragen der Proben für 30 bis 60 sek einer Hochspannungs-

Glimmentladung bei 27 Pa ( $2 \times 10^{-1}$  Torr) in der Aufdampfanlage ausgesetzt. Hierbei wurden durch Ionisierung des Luftsauerstoffs und Spaltung von Kohlenwasserstoff-Kontaminationen auf der Gridoberfläche Ladungen für eine gleichmäßige Adsorption geschaffen.

#### **II.2.5.3.2 Negativ-Kontrastierung**

Die Negativ-Kontrastierung liefert morphologisch auswertbare Ergebnisse bis in den 20 Å-Bereich. Das Kontrastmittel umgibt die biologische Probe, das heißt, dass man nicht die Viren direkt sieht, sondern vielmehr eine genaue Abbildung ihrer Umgebung erhält (Negativabbildung). Innere Virusstrukturen kann man bei dieser Präparationstechnik nur ausmachen, wenn das Kontrastmittel in das Virus eindringt. Von der jeweiligen Suspension wurden mit einer Mikropipette 50 µL auf Parafilm aufgetropft und für ca. 2 min ein beglimmtes Grid auf die Oberfläche des Tropfens aufgebracht. Danach wurde die Flüssigkeit mit einem Streifen Filterpapier vom Grid weitgehend abgesaugt. Das Grid wurde für 3x5 sek durch Ablegen auf der Oberfläche jeweils eines Tropfens Aqua bidest, die auch auf dem Parafilm aufgetropft vorliegen, gewaschen. Zwischendurch wurde das Wasser mit einem Streifen Filterpapier abgesaugt. Schließlich wurde das Grid je nach Dichte des Ausgangsmaterials für 5 bis 20 sek auf einen Tropfen Kontrastmittel (Uranylacetat) gelegt. Das Kontrastmittel wurde mit feuchtem Filterpapier schonend abgesaugt und das Grid an der Luft getrocknet.

#### **II.2.5.3.3 Einbettung von Gewebeproben und Zellen in Epon**

Die Ultradünnschnitttechnik ermöglicht die Darstellung von Virus-Wirtszell-Wechselwirkungen sowie den Blick in zelluläre, möglicherweise virusenthaltende Kompartimente. Die Gewebeproben bzw. Zellen werden mit Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid (2,5 % in HEPES 0,05 M) fixiert, mit Tannin und Uranylacetat behandelt, bevor sie in Epon eingebettet werden. Die so eingebetteten Proben werden mit einem Ultramikrotom geschnitten, auf einem Grid gelegt, mit Bleicitrat nachkontrastiert und am Elektronenmikroskop ausgewertet.

Die Glutaraldehyd-fixierten Zellproben wurden bei 2500xg für 10 min sedimentiert. Das Zellsediment wurde dreimal mit Aqua bidest. gewaschen und anschließend in PBS aufgenommen. Nun erfolgte die Postfixierung mit mit 2 %-



igem Osmiumtetroxid ( $\text{OsO}_4$ ) für ca. 1 h bei 4 °C im Dunkeln. Nach der Behandlung wurde das Präparat dreimal in Aqua bidest. gewaschen (Zellen jeweils sedimentiert; 5 min, 2500xg), um überschüssiges  $\text{OsO}_4$  zu entfernen. Die  $\text{OsO}_4$ -geschwärzten Zellen wurden in 3 %-iger Agarose eingebettet. Die Agaroseblöckchen mit den eingeschlossenen Zellen bzw. Gewebe wurden in 0,2 %-igen Tannin in frisch angesetzten Hepes für 45 min bei 4 °C im Dunkeln unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Tannin dient zur Kontrastierung von Zellorganellen. Anschließend wurde das Tannin gegen 1 %-iges Natriumsulfat in Hepes ausgetauscht und die Blöckchen für 10 min bei 4 °C im Dunkeln unter gelegentlichem Schütteln vom Tannin ausgewaschen. Dann wurde zweimal für 10 min mit Aqua bidest gewaschen (bei 4 °C im Dunkeln). Nun erfolgte die Blockkontrastierung mit 2 %-igem Uranylacetat (2 h bei 4 °C im Dunkeln)..Das Uranylacetat wurde im Anschluss gegen Aqua bidest. ausgetauscht und für 10 min bei 4 °C gewaschen.

Vor dem Einschluss in die hydrophobe organische Epoxidharzmischung wurden die Proben stufenweise in einer aufsteigenden Ethanolreihe (30 % für 20 min, 50 % für 20 min, 2 x 70 % für je 10 min, 2 x 95 % für je 10 min und 4 x in Ethanol absolut für je 15 min) unter ständigem Rotieren in einem Rotationsmischer bei RT entwässert werden. Danach wurden die Proben für 2 x 30 min in Propylenoxid inkubiert und anschließend durch Epon-Propylenoxid (1 h im 1:2-Gemisch, dann 30 min im 1:1-Gemisch) ersetzt und über Nacht mit offenen Röhrchen bei RT im Rotationsmischer inkubiert, damit der Propylenoxid-Anteil abdampft. Durch die Verdunstung des leicht flüchtigen Propylenoxid kommt es zur Konzentration des Einbettungsgemischs und zur gründlichen Infiltration der Proben. Die vollständige Entwässerung und Infiltration wurden durch das völlige Absinken der Agarblöckchen auf den Boden des Röhrchens angezeigt. Danach wurde das zurückgebliebene Epon abgesaugt und durch Epon + 1,3 % (v/v) DMP-30 (Dimethylaminophenol) für ca. 3 h bei RT unter ständigem Rotieren ersetzt. Zur Einbettung wurden Gelatinekapseln 2 h bei 60 °C getrocknet. Die Blöckchen wurden anschließend mit einer spitzen Nadel auf dem Boden der Kapsel orientiert und diese mit Hilfe einer 5 mL Einwegspritze randvoll mit Epon + 1,3 % (v/v) DMP-30 gefüllt. Die Gelatinekapseln wurden zur Auspolymerisierung des Epoxidharz bei 60 °C im Brutschrank für zwei Tage gebacken.

Nach dem Trimmen der Proben (TM-60) wurden Semidünnschnitte (300 bis 500 nm) bzw. Ultradünnschnitte (30 bis 50 nm) an einem Ultramikrotom mit einem Diamantenmesser angefertigt und auf einen Objektträger aufgelegt. Die Schnitt-Nachkontrastierung erfolgt mit Bleicitrat nach Reynolds [1963]. Dazu wurde ein Tropfen Bleicitrat und drei Tropfen 0,02 M Natriumhydroxid (NaOH) für 15 sek auf die Grids mit den Proben gegeben. Anschließend wurden die Grids mit einer Pipette schnell nacheinander durch die NaOH-Tropfen gezogen und für 3 bis 5 sek in Aqua bidest. gewaschen und luftgetrocknet.

#### **II.2.5.3.4 Auswertung am EM und fotografische Dokumentation**

Die negativ-kontrastierten Präparate wurden an einem Zeiss EM 10 A TEM bei einer Vergrößerung von 40.000x betrachtet. Die Befunde wurden auf Scienta Planfilmen bei automatischer Belichtungssteuerung mit Zeiten von ca. 1 sek dokumentiert. Die Negative wurden mit AGFA-Refinal 8 bis 10 min bei 20° C entwickelt, und Kontaktabzüge sowie Nachvergrößerungen einzelner Negative wurden auf Agfa Record Rapid-Fotopapier der Härtegrade 1 bis 4 angefertigt.

## II.2.6 Isolierung und Analyse von RNA

Bei Arbeiten mit RNA wurde wegen des schnellen Abbaus der RNA durch RNasen das Wasser mit DEPC behandelt. DEPC inaktiviert die in Lösungen befindlichen RNasen. Dazu wurde 0,1 % DEPC ÜN bei 37 °C gerührt und durch anschließendes Autoklavieren inaktiviert.

### II.2.6.1 RNA-Isolierung aus Gewebe

Methode 1:

Die Extraktion von RNA aus verschiedenen Gewebetypen wurde zum einen nach der Methode von Chirgwin et al. [1979] und zum anderen mit dem RNeasy® Midi oder Mini Kit von Qiagen vergleichend durchgeführt.

Die RNA-Extraktion nach Chirgwin et al. [1979] erfolgte durch Gewinnung der Gesamt-RNA aus einem Guanidiniumisothiocyanat (GTC)-Lysat mittels Ultrazentrifugation (UZF) durch ein Cäsiumchlorid (CsCl)-Kissen. Dazu wurden am ersten Tag die in flüssigem Stickstoff gelagerten Proben zunächst gewogen und dann durch Disruption mit einem Hammer aufgeschlossen. Das Pulver wurde in je ein 50 mL-Röhrchen mit 8 mL GTC-Lösung überführt und auf Eis gehalten. Die Zugabe von  $\beta$ -ME zur GTC-Lösung erfolgte erst kurz vor Beginn der Präparation. Anschließend wurden die Proben mit Hilfe eines Ultra-Turrax TB homogenisiert. Um Kreuzkontaminationen zwischen den einzelnen Proben zu vermeiden, wurde das Dispergierwerkzeug nach jedem Homogenisiervorgang eine Minute lang in Aqua bidest. Wasser, danach für 10 min in 1 % SDS, anschließend für weitere 10 min in Ethanol (reinst) gereinigt. Zur Ultrazentrifugation wurden je 2,6 mL eines CsCl-Kissens in ein Polyallomer (PA)-Röhrchen gegeben und anschließend mit der homogenisierten Probe überschichtet. Die Röhrchen wurden danach bis knapp unter den Rand mit GTC-Lösung aufgefüllt und auf einer Waage austariert. Danach wurden die Proben in einer Beckman-Ultrazentrifuge mit einem SW40-Rotor bei 115.000xg (22 °C, 24 h) zentrifugiert.

Am zweiten Tag wurde der Überstand dekantiert und um den Rest des Überstandes zu entfernen, wurden die Röhrchen kurz über Kopf gestellt und anschließend auf Eis gehalten. Das Sediment wurde in 200  $\mu$ L TSPE-Puffer gelöst und in ein Polypropylen (PP)- Zentrifugenröhrchen überführt, um dann erneut

mit 200 µL TSPE-Puffer nachzuspülen und diese ebenfalls in das jeweilige Röhrchen zu geben. Anschließend wurden 0,1 Vol 3 M Natriumacetat (pH 6,0) und 10 mL Ethanol (96 %) zugegeben. Die Ethanolfällung fand ÜN bei -20 °C statt, um die RNA zu konzentrieren und störende Salze zu entfernen.

Am dritten Tag wurden die Proben in einer Kühlzentrifuge bei 20.000 x g (-10 °C, 1 h) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und verworfen, das Sediment wurde für 5 min bei RT getrocknet und danach auf Eis gestellt, um es dann in 200 µL Wasser zu lösen und in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß zu überführen. Danach wurde mit 100 µL Wasser nachgespült und ebenfalls in das jeweilige 1,5 mL-Reaktionsgefäß gegeben. Nach der Zugabe von 0,1 Vol Natriumacetat (pH 6,0) und 2,5 Vol Ethanol (96 %) erfolgte eine weitere Fällung zur Konzentrierung der RNA ÜN bei -20 °C.

Am vierten Tag wurde das RNA-Präzipitat in einer Kühlzentrifuge bei -10 °C und 15.000xg für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen und verworfen. Das Sediment wurde zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen und danach jeweils für 5 min zentrifugiert. Zum Trocknen des Sediments wurden die 1,5 mL-Reaktionsgefäße kopfüber auf Zellstoff gestellt und für 1 h stengelassen. Das getrocknete Sediment wurde nun in 100 µL Molekular-Wasser gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C aufbewahrt.

#### Methode 2:

Neben der Methode nach Chirgwin et al. [1979] wurde RNA aus Geweben mit Hilfe des RNeasy® Midi Kits von Qiagen laut Herstellerangaben extrahiert. Dazu wurden die Proben zunächst gewogen, um das zugehörige Vol an RLT-Puffer festzulegen. Anschließend erfolgte die Disruption des gefrorenen Materials mit einem Hammer. Das erhaltene Pulver wurde in das entsprechende Volumen RLT-Puffer gegeben und dann mit einem Ultra-Turrax TB homogenisiert.

Das Lysat wurde für 10 min bei 5.000xg zentrifugiert und der Überstand danach in ein neues 15 mL Röhrchen überführt. 1 Vol Ethanol (70 %) wird zu dem homogenisierten Lysat dazugegeben und sofort gut geschüttelt. Die Proben wurden nun in je eine RNeasy-Midi-Säule überführt und für 5 min bei 5.000xg zentrifugiert, der Durchfluss wurde verworfen. Dieser Schritt wurde solange wiederholt, bis die Proben vollständig auf die Säulen aufgetragen waren. Nun wurden 4 mL RW1-Puffer zu der Säule gegeben und für 5 min bei 5.000xg zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Danach wurde die Säule zweimal

mit 2,5 mL RPE-Puffer gewaschen, einmal für 2 min bei 5.000xg und das zweite Mal für 5 min bei 5.000xg. Zum Eluieren wurde die Säule auf ein neues 15 mL-Röhrchen überführt, das entsprechende Volumen (siehe Herstellerangaben) RNase-freies Wasser auf die Säule pipettiert, 1 min inkubiert und dann für 3 min bei 5.000xg eluiert. Die so aufgereinigte RNA wurde bis zur Weiterverwendung bei -70 °C gelagert.

#### **II.2.6.2. RNA-Isolierung aus Zellkulturüberständen**

Zur Aufreinigung von RNA aus Zellkulturüberständen wurde das RNeasy Mini Kit von Qiagen verwendet und die RNA nach Herstellerangaben extrahiert. 350 µL RLT-Puffer wurden dazu zu den Zellen dazugegeben und gut gemischt, bevor das Lysat in die QIAshredder Zentrifugensäule zugegeben und für 2 min bei 20.000xg zentrifugiert wurde. Die QIAshredder Säule wurde verworfen und das homogenisierte Lysat mit 350 µL Ethanol (70 %) versetzt und gemischt. Die Probe wurde in eine neue QIAamp Zentrifugensäule gegeben und zentrifugiert (8.000xg, 15 sek). Zum Waschen wurden nacheinander 500 µL RW1-Puffer und dann RPE-Puffer zugegeben und jeweils dazwischen zentrifugiert (8.000xg, 15 sek). Dann wurde nochmals 500 µL RPE-Puffer hinzugegeben und bei 20.000xg für 3 min zentrifugiert. Die Säulen wurden nochmals für 1 min bei 20.000xg zentrifugiert. Die Elution der RNA erfolgte durch Zugabe von 30 bis 50 µL RNase-freies Wasser für 1 min bei 8000xg. Die so aufgereinigte RNA wurde bis zur Weiterverwendung bei -70 °C gelagert.

#### **II.2.6.3 Virale RNA-Isolierung aus Zellkulturüberständen**

Zur Aufreinigung von viraler RNA aus Zellkulturüberständen wurde das QIAamp Viral RNA Mini Kit verwendet. Die Aufreinigung der RNA erfolgte mit Hilfe einer Silikagel-Membran. Die so gereinigte RNA ist frei von Protein, Nukleasen und anderen Kontaminationen. Zu 140 µL Probe aus dem die virale RNA isoliert werden soll, wurden 560 µL AVL-Puffer (beinhaltet Träger-RNA) pipettiert und für 15 sek gemischt. Nach einer Inkubation bei RT (10 min) wurden 560 µL 100 % Ethanol dazugegeben und wieder für 15 sek gemischt. Anschließend wurde die gesamte Lösung in eine QIAamp-Zentrifugen-Säule gegeben, und dieses für 1 min bei 6.000xg zentrifugiert. Zum Waschen wurde zunächst 500 µL AW1-Puffer in die Säulen pipettiert, 1 min bei 6000xg abzentrifugiert und anschließend

mit 500  $\mu\text{L}$  AW2-Puffer gewaschen, wobei die Säulen hier 3 min bei 20.000xg zentrifugiert wurden. Die Säulen wurden nochmals für 1 min bei 20.000xg zentrifugiert. Die Elution der RNA erfolgte durch Zugabe von 60  $\mu\text{L}$  AVE-Puffer mit kurzer Inkubation für 1 min bei RT und Zentrifugation für 1 min. bei 6.000xg.

#### II.2.6.4 Linearisierung und *in vitro* Transkription (*in vitro* Synthese von RNA)

Diese Methode ermöglicht es, von einem DNA-Strang RNA zu synthetisieren. Die hier verwendete Methode setzt voraus, dass sich die gewünschte DNA in einem Vektor befindet, der eine SP6-RNA-Polymerase-Bindungsstelle hat. Für diese Zwecke wurde der pACNR1181-Vektor genutzt, ein Vektor, der den Promotor für die RNA-Polymerase des Bakteriophagen SP6 aus *Salmonella typhimurium* trägt. Bevor das Plasmid mit Hilfe der *in vitro* Transkription in infektiöse RNA umgeschoben wurde, wurde das Plasmid mit einem einfach schneidenden Restriktionsenzym am 3'-Ende linearisiert. Dazu gab man zu dem Plasmid (ca. 2  $\mu\text{g}$ ) 0,7  $\mu\text{L}$  Xho [20 Unit/ $\mu\text{L}$ ], 0,3  $\mu\text{L}$  BSA [10 mg/mL], 3,0  $\mu\text{L}$  Puffer2 [10x] und 25,0  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O dazu und inkubierte für 1 h bei 37 °C. Anschließend erfolgte eine Phenol-Chloroform Extraktion, sowie eine Ethanol-Fällung. Diese DNA wurde in die *in vitro* Transkription (Tabelle II.13) eingesetzt.

TABELLE II.13:  
*In-vitro-Transkription. Reagenzien und Reaktionsbedingung*

Reagenz	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]	Dauer	T [°C]
Wasser	0,25	1 h	40
Puffer 5xSP6	5,00		
DTT [10 mM]	2,50		
NTP [2,5 M]	5,00		
CAP [10 mM]	1,25		
RNaseOut [40 U/ $\mu\text{L}$ ]	0,50		
DNA	10,00		
SP6-Polymerase [15 U/ $\mu\text{L}$ ]	0,50		
Gesamtvolumen	20,00		

Nach der Transkription erfolgte die Bestimmung der RNA-Konzentration über die Messung der optischen Dichte. Zusätzlich wurde eine bestimmte Menge RNA auf ein RNA-Gel aufgetragen und die korrekte Größe der RNA-Transkripte bestimmt.

#### **II.2.6.5 Transfektion von RNA in Zellen**

Die Transfektion der eukaryotischen Zellen mit RNA erfolgte mit Hilfe von Lipofectin-Reagenzien (Qiagen: Effectene, Superfect, Invitrogen: Lipofectamine2000). Dabei handelt sich um das Gemisch zweier kationischer Lipide, die mit Nucleinsäuren spontan Lipid-Nucleinsäure-Komplexe in Form von Liposomen ausbilden [Felgner et al., 1987]. Diese Liposomen fusionieren mit den Zellen und bewirken so die Aufnahme der Nucleinsäuren.

Das Verhältnis von Nucleinsäure zu Reagenz und die Zelldichte für optimale Ergebnisse sind dabei allerdings vom Zelltyp abhängig. Zur Erzielung optimaler Transfektionsergebnisse wurden die Zellen am Vortag so umgesetzt, dass sie zur Transfektion 50-60 % konfluent waren. Die Angaben beziehen sich auf den Ansatz für eine 35-mm-Schale. Eingesetzt wurden je 1 bis 4 µg RNA bzw. 4 µL eines *in vitro* Transkriptionsansatzes. Im Übrigen wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren. Um zytopathogene Effekte durch das Transfektionsreagenz zu vermeiden, wurde der Überstand nach 4 bis 6 h abgenommen und durch frisches Medium mit FKS ersetzt.

#### **II.2.6.6 Gewinnung zellfreier virushaltiger Überstände**

Nach erfolgter Transfektion von virusexprimierender DNA bzw. Infektion von Zellen wurden zellfreie Virusüberstände geerntet. Dazu wurde das virusenthaltende Medium mit einer sterilen Spritze aufgenommen und durch einen sterilen 0,45 µm-Filter (FP 30/0,45 CA-S; Schleicher & Schuell) filtriert. Zellfreie Virusüberstände wurden aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt oder für kurze Zeit bei 4 °C gelagert.

## **II.2.7 Standard DNA-Techniken**

### **II.2.7.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte durch absorptionspektrophotometrische Messung an einem Bio-Photometer geeigneter Nukleinsäure-Verdünnungen bei 260 nm gegen Wasser. Eine  $OD_{260}$  von 1 entspricht einer RNA-Konzentration von 40  $\mu\text{g/mL}$ , einer doppelsträngiger DNA-Konzentration von 50  $\mu\text{g/mL}$  und einer einzelsträngigen DNA Konzentration von 37  $\mu\text{g/mL}$ . Das Verhältnis  $OD_{260}/OD_{280}$  gibt Aufschluss über die Reinheit der Nukleinsäure, da Proteinkontaminationen berücksichtigt werden. Bei reinen Nukleinsäure-Lösungen sollte der Quotient zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

### **II.2.7.2 Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanolfällung von Nukleinsäuren**

Um Proteine aus wässrigen Nukleinsäurelösungen zu entfernen, wurden diese nach Sambrook et al. [1989] durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt. Es wurde 1 Vol puffergesättigtes Phenol zugegeben, gemischt und nach einer zweiminütigen Zentrifugation bei 15.000xg wurde die nukleinsäurehaltige obere Phase abgenommen und in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. In gleicher Weise wurde nun mit Chloroform extrahiert.

Bei der Zugabe von Ethanol in Gegenwart einer hohen Salzkonzentration entzieht der Alkohol den Nukleinsäuremolekülen die Hydrathülle, woraufhin es zu deren Aggregation kommt. Während niedermolekulare Oligonukleotide, Nukleotide und Salze in Lösung bleiben, können langkettige Nukleinsäuren durch Zentrifugation sedimentiert werden. Dazu wurde die Nukleinsäure mit 10  $\mu\text{L}$  3 M Natriumacetat (pH 7,0) bzw. bei RNA-Extraktionen mit 2 M Kaliumacetat (pH 5,6) und 2,5 Vol Ethanol (96 %) gefällt. Nach gutem Mischen wurde für 30 min bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert und anschließend bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 15 min bei 15.000xg zentrifugiert. Es erfolgte ein Waschschriff mit Ethanol (70 %). Dann wurde der Überstand abgenommen und das Sediment getrocknet und im geeigneten Volumen Wasser aufgenommen.



### **II.2.7.3 Agarose-Gelelektrophorese von DNA und RNA**

Die elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren erfolgte in horizontalen Gelelektrophoresekammern mit 1 bis 1,5 %igen Agarosegelen. Zur Herstellung der Gele und als Laufpuffer wurde 1xTBE verwendet. Zur Herstellung des Agarosegels wurde die erforderliche Menge Agarose in 50 mL Puffer gegeben und durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nachdem das gelöste Gel auf etwa 60 °C abgekühlt war, wurde 1 µL Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/mL) hinzugegeben und das Gel in einem vorbereiteten Gelträger gegossen. Als Längenstandard wurden 100 bp- und 1 kb-DNA-Leiter bzw. RNA Leiter mitgeführt. Die Proben wurden vor Zugabe in die Geltaschen mit einem Gel-Beladungspuffer beschwert. Die Proben wurden bei 5 bis 8 Volt/cm aufgetrennt und mit UV-Licht sichtbar gemacht. Die Aufnahme erfolgte mit einem Geldokumentationsgerät.

### **II.2.7.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des QIAEX II Kits (Qiagen), mit dem Nukleinsäuren an Glaspartikel binden [Vogelstein & Gillespie, 1979]. Die Fragmente wurden zuerst mit Hilfe von UV-Licht bei einer Wellenlänge von 365 nm sichtbar gemacht und der Gelbereich, mit der gewünschten DNA-Bande wurde mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Das Stück wurde gewogen und mit dem 3-fachen Vol QX1-Puffer versetzt (300 µL für 100 mg Gelstück). 30 sek wurde gut gemischt und 10 bis 30 µL QIAEX II hinzugegeben und gemischt. Es erfolgte eine Inkubation von 10 min bei 50 °C um die Agarose zu schmelzen und die DNA zu binden. Danach wurde für 30 sek zentrifugiert und der Überstand vorsichtig entfernt. Das Sediment wurde einmal mit je 500 µL QX1- und zweimal mit PE-Puffer gewaschen. Das Sediment wurde für 10 bis 15 min luftgetrocknet. Aufgenommen wurde die DNA mit 20 µL Wasser und für ca. 5 min bei RT inkubiert. Dann wurde für 30 sek zentrifugiert und der Überstand mit der DNA in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

### **II.2.7.5 Klonierung mit Hilfe des TOPO-TA-Cloning-Kit (Invitrogen)**

Die sogenannte TA-Klonierung beruht auf der Tatsache, dass die Taq-Polymerase keine Fragmente mit glatten Enden produziert, sondern mit Hilfe einer unspezifischen, terminalen Transferase-Aktivität einzelne Desoxyadenosine (A) an das 3'-Ende des PCR-Produkts anfügt [Clark, 1988]. Durch die Konstruktion eines linearen Vektors mit überhängenden 3'-Thymidin-Resten lassen sich PCR-

Fragmente so sehr effizient klonieren. Eine Variante dieser Klonierungsstrategie bietet der TOPO-TA-Cloning-Kit (Invitrogen). Für die Klonierung wurden kurz zuvor mit Taq-Polymerase amplifizierte PCR-Fragmente verwendet, die wenn notwendig über ein Gel aufgereinigt wurden. Pro Reaktionsansatz wurden 0,5 bis 1  $\mu\text{L}$  Vektor (1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) eingesetzt. Dazu wurden 0,4 bis 4  $\mu\text{L}$  PCR-Produkt und zusätzlich 1  $\mu\text{L}$  Salzlösung (1,2 M NaCl, 0,06 M  $\text{MgCl}_2$ ) gegeben. Die Reaktion wurde gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden chemisch kompetente Bakterien transformiert (One Shot Mach1-T1, Invitrogen). Die transformierten Zellen wurden auf vorgewärmten LB-Agarplatten (mit 1,5 % w/v Agar) mit 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Ampizillin ausplattiert und ÜN bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

#### **II.2.7.6 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen**

Zur Analyse und Klonierung von Plasmid-DNA wurden Restriktionsendonukleasen des Typs II, die spezifische Sequenzen in doppelsträngiger DNA erkennen und hydrolysieren, genutzt. Für den analytischen Restriktionsverdau wurden 0,2-1,0  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA eingesetzt. Ein Restriktionsverdau zur Analyse von Plasmidpräparationen erfolgte in einem Gesamtvolumen von 10  $\mu\text{L}$  bzw. in 30  $\mu\text{L}$  bei einem Restriktionsverdau für nachfolgende Klonierungen. Nach Angaben des Herstellers wurden 1/10 der angegebenen Pufferlösung (10-fach) eingesetzt und, falls nötig, 1/100 BSA dazugegeben. Vom jeweiligen Enzym wurden 5 Unit/ $\mu\text{g}$  DNA dazugegeben, jedoch nicht mehr als ein 1/10 des Gesamtvolumens, da sich das im Lagerungspuffer des Enzyms enthaltene Glycerol negativ auf die Reaktion auswirken kann. Im Falle von Doppelverdaus musste ein Reaktionspuffer gewählt werden, in dem beide Enzyme eine ausreichend hohe Aktivität besitzen. Als Alternative wurde nach dem Verdau mit dem ersten Enzym eine Ethanol-Fällung durchgeführt, um anschließend die DNA mit dem zweiten Enzym verdauen zu können. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für eine Stunde.

Danach erfolgte die Auftrennung der DNA-Fragmente auf einem Agarosegel bzw. eine Phenol-Chloroform-Behandlung. Geschnittene DNA wurde bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert.

### **II.2.7.7 Dephosphorylierung**

Linearisierte Plasmide neigen dazu sich wieder zu schließen, bevor sie ein DNA-Fragment inseriert haben. Damit keine Religation stattfindet, werden die 5'-Phosphatreste der Plasmid-DNA durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase (CIP) abgespalten. Zur Dephosphorylierung wurden 1 bis 2 µg DNA mit alkalischer Phosphatase (1 Unit) versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde eine Phenol-Chloroformextraktion mit anschließender Ethanolfällung durchgeführt.

### **II.2.7.8 Ligation von DNA-Fragmenten mit DNA-Ligase**

Für die Ligation linearisierter Vektoren mit entsprechenden DNA-Fragmenten wurde die T4-DNA-Ligase verwendet. Mit Hilfe von ATP und Mg<sup>2+</sup>-Ionen katalysiert die T4-DNA-Ligase (1 Unit/µL) die Ausbildung einer kovalenten Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe und der 3'-Hydroxylgruppe von DNA-Molekülen. Um eine möglichst effektive Ligation zu erhalten, sollte das Verhältnis von Vektor zu klonierendem Fragment etwa 1:3 betragen. In diesem Reaktionsansatz wurde außerdem 1x Ligationspuffer hinzugegeben und ÜN bei 14 °C inkubiert.

### **II.2.7.9 Polymerasekettenreaktionen (PCR)**

#### **II.2.7.9.1 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)**

Bei der reversen Transkriptase (RT-PCR) handelt es sich um eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die von einer einzelsträngigen RNA als Matrize ein RNA/DNA-Hybrid herstellt, das nachfolgend für die PCR eingesetzt werden kann.

Bei Serumproben wurde eine 1:10 und 1:100-Verdünnung vor der RT-PCR und der TaqMan-PCR durchgeführt, da sich im Serum oftmals PCR-Inhibitoren befinden und so heraus verdünnt werden können.

TABELLE II.14:  
*RT-PCR. Reagenzien und Reaktionsbedingung*

Reagenz	Volumen [µL]	Dauer	T [°C]
Wasser	7,00	3 min	72
5 x Puffer I	2,00	30 sek	auf Eis
DTT [0,1 mM]	2,00	anzentrifugieren	auf Eis
dNTP-Mix [2,5 mM]	5,00		
Random Hexamer [3 µg/µL]	0,50	2-3 min	
	16,50		
RNA	2,00	Nach RNaseOut und Superscript Zugabe:	
RNaseOut [40 U/µL]	1,00	10 min	24
Superscript [200 U/µL]	0,50	40 min	42
Gesamtvolumen	20,00	5 min	83

### II.2.7.9.2 Mykoplasmen-PCR

Vor Beginn der Zellkultur-Versuche wurde mittels PCR auf die intrazellulären Parasiten Mykoplasma und Acholeplasma (Mykoplasmen) getestet. Der Nachweis beruht auf der Detektion eines 280 bp Abschnitts des 16S-rRNA-Gens, der für Mykoplasmen spezifisch ist [van Kuppeveld et al., 1993]. Zunächst wurden Proben für 5 min bei 95 °C inkubiert und danach 1:10 verdünnt in die Mykoplasmen-PCR eingesetzt.

TABELLE II.15:  
*Mykoplasmen-PCR. Reagenzien und Reaktionsbedingung*

Reagenz	Volumen [µL]	Dauer	T [°C]	Zyklen
Wasser	17,65	5 min	94	41
10 x Taq-Puffer	2,50	3 min	72	
MgCl <sub>2</sub> [50 mM]	0,75	45 sek	94	
dNTP-Mix [2,5 mM]	0,50	45 sek	55	
GPO-3-Primer [50 µM]	0,50	10 min	72	
MGSO-Primer [50 µM]	0,50	10 min	27	
Taq-Polymerase [5 U/µL]	0,10	Pause	4	
	22,50			
Probe (1:10 verdünnt)	2,50			
Gesamtvolumen	25,00			

### II.2.7.9.3 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR wurde dazu verwendet, diejenigen Bakterien-Klone zu identifizieren, die das gewünschte DNA-Fragment im Plasmid enthalten. Es wurden dazu Einzelkolonien isoliert und in je 50 µL Wasser gegeben. Von diesem,

die Kolonie enthaltenen Wasser, wurden 5  $\mu\text{L}$  in LB-Medium (+ Ampizillin, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) überimpft und zur späteren Animpfung bei 4  $^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Die Kolonien im Wasser wurden resuspendiert und dann für je 5 min bei -80  $^{\circ}\text{C}$  und 100  $^{\circ}\text{C}$  inkubiert, um die Zellen aufzuschließen. Die Zellwandbestandteile und die unlöslichen Zellbestandteile wurden kurz abzentrifugiert, so dass sich im Überstand nun die löslichen Zellbestandteile und die Plasmide befanden. Das inserierte Fragment befindet sich in der TOPO<sup>®</sup> Cloning site des Vektors zwischen der T7 Promoter-Bindungsstelle und der BGH reversen Bindungsstelle. Der Abschnitt zwischen beiden Primern (inklusive der beiden Primer) ist 266 bp groß. Die Insert enthaltenen Plasmide und die daraus resultierenden Amplifikationsprodukte sind entsprechend größer.

TABELLE II.16:  
*Kolonie-PCR. Reagenzien und Reaktionsbedingungen*

Reagenz	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]	Dauer	T [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Zyklen
Wasser	17,55	2 min	94	35
10 x Taq-Puffer	2,50	30 sek	94	
MgCl <sub>2</sub> [50 mM]	0,75	30 sek	64	
dNTP-Mix [10 mM]	0,50	60 sek	72	
T7-Primer [25 $\mu\text{M}$ ]	0,50	3 min	72	
BGH-Primer [25 $\mu\text{M}$ ]	0,50	$\infty$	4	
Taq-Polymerase [5 U/ $\mu\text{L}$ ]	0,20			
	22,50			
Plasmid-DNA	2,50			
Gesamtvolumen	25,00			

#### II.2.7.9.4 TaqMan- Polymerasekettenreaktion (TaqMan-PCR)

Die Quantifizierung der Nukleinsäure erfolgte mit der TaqMan-PCR. Anders als bei der herkömmlichen PCR, kann hier durch ein spezielles Sondendetektionssystem nach jedem Zyklus die Menge an amplifizierter DNA bestimmt werden. Die direkte Detektion von PCR Produkten erfolgte durch die Freisetzung eines fluoreszierenden Reporters während der PCR, dessen Konzentration durch den ABI PRISM 7700 Sequence Detektor gemessen wurde [Holland et al., 1991, Gelfand et al., 1992].

TABELLE II.17:  
TaqMan-PCR. Reagenzien und Reaktionsbedingung

Reagenz	Volumen [µL]	Dauer	T [°C]	Zyklen
Wasser	33,5	3 min	94	45
10 x Puffer I	5,0	30 sek	94	
MgCl <sub>2</sub> [50 mM]	4,0	60 sek	60	
dNTP-Mix [5 mM]	2,0			
Primer sense [10 µM]	1,0			
Primer antisense [10 µM]	1,0			
Sonde [10 µM]	0,5			
ROX [50x]	0,5			
Platinum Taq Polymerase [5 U/µL]	0,5			
	48,0			
Probe	2,0			
Gesamtvolumen	50,0			

#### II.2.7.9.5 Quantitect One Step RT-PCR

Diese Methode ermöglicht Reverse Transkription sowie eine PCR-Reaktion in einem Ansatz. Drei verschiedene Enzyme übernehmen diese Funktion: die Omniscript™/Sensiscript™ Reverse Transkriptasen und die HotStarTaq™ DNA Polymerase. Die Omniscript Reverse Transkriptase ist für Reaktionen mit mehr als 50 ng RNA geeignet, die Sensiscript Reverse Transkriptase für sehr kleine RNA-Mengen. Die DNA Polymerase ist während der reversen Transkription inaktiv. Erst durch Erhitzen der Proben auf 95 °C für 15 min nach der reversen Transkription wurde die HotStarTaq DNA Polymerase aktiviert. Gleichzeitig kommt es zu einer Inaktivierung der Reversen Transkriptasen. Die oben beschriebene TaqMan-PCR wurde mit dieser Quantitect-Methode für 25 µL-Ansätze mit einem Viertel der benötigten Enzymmenge optimiert.

TABELLE II.18:  
Quantitect-TaqMan-PCR. Reagenzien und Reaktionsbedingung

Reagenz	Volumen [µL]	Dauer	T [°C]	Zyklen
Wasser	15,37	30 min	50	45
2xQiagen Mix	6,25	15 min	95	
Primer sense [10 µM]	1,00	15 sek	94	
Primer antisense [10 µM]	1,00	60 sek	60	
Sonde (10 µM)	0,50			
RT-Enzymmix	0,13			
	23,00			
Probe	2,00			
Gesamtvolumen	25,00			

### II.2.7.9.6 Detektion von Zytokinen mittels TaqMan-PCR

TABELLE II.19:  
Sequenzen der Oligonukleotide (Sonden und Primer) für IL-3, IL-10 und GM-CSF

Primer/Sonde	Sequenz
IL-3 sense	GCT CCC ATG ACC CAG ACA AC
IL-3 antisense	GGC AGA CAT GGC AGG AGA TT
IL-3 Sonde	AGC TGG GTT AAC TGC TCT AAC ATG ATC GAT GAA A
IL-10 sense	AGG CTA CGG CGC TGT CAT C
IL-10 antisense	GGC ATT CTT CAC CTG CTC CA
IL-10 Sonde	CTT CCC TGT GAA AAC AAG AGC AAG GCC
GM-CSF sense	GCC CTG GGA GCA TGT GAA T
GM-CSF antisense	CTG GGT TGC ACA GGA AGT TTC
GM-CSF Sonde	AGG CCC GGC GTC TCC TGA ACC T

Oligonukleotide wurden von TIB Molbiol synthetisiert. Die Sequenzen von  $\beta$ -Aktin, IL-2, IL-4, IL-5 IL-13 und IFN- $\gamma$ , sowie die Reaktionsbedingungen sind bereits vorher beschrieben worden (Pahl et al. 2002).

Die Expression der Zytokin-mRNA wurde in Relation zu  $\beta$ -Aktin mittels TaqMan-PCR bestimmt. Die Änderungen in der Genexpression wurden mit der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode quantifiziert:  $C_T$  (Parameter) -  $C_T$  (Aktin) =  $\Delta C_T$  (Komponente X). Dieser Wert wurde in Relation zu der Kontrolle gesetzt, die das mRNA Niveau von unstimulierten Zellen beinhaltet:  $\Delta C_T$  (Komponente X) -  $\Delta C_T$  (Kontrolle) =  $\Delta\Delta C_T$  (Komponente X2). Das relative mRNA Niveau für die Komponente X2 wurde dann als  $2^{-\Delta\Delta C_T} \times 100 \%$  kalkuliert, beruhend auf den Ergebnissen der Kontrolllexperimente, in denen die Effizienz der PCR Reaktion annähernd 100 % war (laut Applied Biosystems User Bulletin 2; ABI PRISM 7700 Sequence Detection System, 1997).

### II.2.7.9.7 Nachweis von Referenzgenen mittels PCR

Die absolute und die relative Quantifizierung sind zwei Möglichkeiten die Konzentration von Nukleinsäuren zu bestimmen [Pfaffl, 2004]. Für die absolute Quantifizierung wird eine Standardreihe aus Proben mit bekannter Kopienzahl erstellt. Die  $C_T$ -Werte der zu untersuchenden unbekanntenen Proben können mit denen der Standardreihe verglichen werden, so dass sich daraus die absolute Kopienzahl der zu untersuchenden Proben ergibt.

Für die relative Quantifizierung werden die erhaltenen  $C_T$ -Werte des untersuchten Genomabschnitts im Verhältnis zu den  $C_T$ -Werten eines internen Referenzgenes bestimmt. Die Proben werden sowohl auf das gewünschte Gen (oder den gewünschten Genomabschnitt) als auch auf das Referenzgen untersucht. Dabei erhält man das Verhältnis der Kopien des untersuchten Genomabschnitts im Verhältnis zum Referenzgen [Livak und Schmittgen, 2001]. Wegen der unterschiedlichen Ausgangsmenge an RNA und der schwankenden Effektivität ist eine Referenzgen-PCR anzuraten [Bustin, 2000; Vandesompele et al., 2002]. Weiterhin kann durch eine auf mRNA basierende Referenzgen-PCR nachgewiesen werden, dass die RNA-Extraktion erfolgreich durchgeführt wurde, insbesondere bei Proben, die als Negativkontrolle für den untersuchten Sequenzabschnitt dienen. Als Referenzgen wurde die mRNA von  $\beta$ -Aktin genommen, ein „house keeping gene“, das in fast allen Organen auf niedrigem Niveau exprimiert wird. Im späteren Verlauf der Arbeit wurden weitere zehn Referenzgene (Glyceraldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase (GAP),  $\beta$ -Aktin (Act), Peptidyl Prolyl Isomerase A (PPI), Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P), TATABox-bindendes Protein (TBP),  $\beta$ 2-Mikroglobulin ( $\beta$ 2M),  $\alpha$ -Tubulin (Tub), ribosomales Protein L13 (L13), Phospholipase A2 (PLA) und RNA-Polymerase II (RPII)), in Kooperation mit Aleksandar Radonic, hinsichtlich ihrer Verwendbarkeit für gelbfieberinfizierte Zellen untersucht. Die Primer, TaqMan-Sonde und die Bedingungen für die Referenzgene sind zuvor [Radonic et al., 2004] beschrieben worden. Zur Bestimmung der stabilen Referenzgene wurden die auf Excel basierenden BestKeeper und die GeNorm Software benutzt [Pfaffl et al., 2004, Vandesompele et al., 2002].

#### II.2.7.9.8 Sequenzierung von DNA

Für Sequenzierungen von Plasmid-DNA und PCR-Fragmenten wurde das ABI PRISM<sup>®</sup> Big Dye<sup>®</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit verwendet. Dabei handelt es sich um ein stochastisches PCR-Kettenabbruch-System nach der „Dideoxy“-Methode, bei dem die zum Abbruch führenden Nukleotidderivate vier verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe tragen [Sanger et al., 1977, Smith et al., 1986]. Die daraus resultierenden unterschiedlich langen Fragmente werden dann in einer hoch auflösenden Gelelektrophorese aufgetrennt. Zur Sequenzierung von Plasmid-DNA wurden 10 bis 20 ng DNA pro Ansatz verwendet, DNA aus (RT-)



PCR-Ansätzen wurde gereinigt und dann 5  $\mu\text{L}$  der jeweiligen gereinigten DNA eingesetzt.

TABELLE II.20:  
*Sequenzierung. Reagenzien und Reaktionsbedingungen*

Reagenz	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]	Dauer	T [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Zyklen
Wasser	4,5 / 5,0	1-2 min	96	25
BigDye Puffer	1,0 / 1,5	10 sek	96	
BigDye 3.1 Mix	2,0 / 1,0	5 sek	45-60	
Primer [10 pmol/ $\mu\text{L}$ ]	0,5 / 0,5	4 min	60	
	8,0	$\infty$	4	
DNA [10-20 ng]	2,0			
Gesamtvolumen	10,0			

Die Sequenzreaktionen wurden im Biometra T Gradientencycler durchgeführt. Nach der Reaktion wurden die Ansätze durch Gelfiltration aufgereinigt und anschließend in einem Kapillarelektrophorese-Sequenzierautomaten aufgetrennt.

#### II.2.7.9.9 Gerichtete Mutagenese

In der reversen Genetik werden mittels gezielter Mutagenese Mutationen im Genabschnitt an vorbestimmter Stelle eingeführt und untersucht, wie sich dies auf die Funktion einer Zelle oder eines Organismus auswirkt. Aus den Veränderungen wird dann auf die Funktion des Gens geschlossen. Mit Hilfe vom Stratagene „QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ einer PCR-basierten Technik können gezielt Mutationen, wie Punktmutationen, Insertionen oder Deletionen, in eine Nukleotidsequenz eingeführt werden. Das Prinzip einer solchen PCR-gestützten Mutagenese beruht auf der Verwendung von *mismatch*-Primern, die sich in ihrer Sequenz in einem Nukleotid oder wenigen Nukleotiden von der Matrizen-DNA unterscheiden, die zu der gewünschten Mutation führen. Das QuikChangeSite-Directed Mutagenesis Kit wurde zur Einführung von Basensubstitutionen in den infektiösen Klon YFV pACNR/FLYF-17D verwendet. Dabei wurde in einer ersten Reaktion durch eine PCR die gewünschte Mutation eingeführt. Als Matrizen-DNA dient ein zirkuläres Plasmid, welches die zu mutierende Sequenz beinhaltet. Die *mismatch*-Primer wurden so ausgewählt, dass sie möglichst in ihrer Mitte die gewünschten Nukleotidaustausche tragen und sich an die fast homologe Sequenz der komplementären DNA-Stränge

anlagern können. Mit Hilfe von Stratagenes „QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ kann zirkuläre DNA amplifiziert werden unter Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase (Pfu-Turbo) sowie einer thermostabilen DNA-Ligase („*Ligation-During-Amplification*“) [Chen und Ruffner, 1998; Shenoy und Visweswariah, 2003]. Endprodukt dieser PCR ist eine zirkuläre, doppelsträngige DNA.

TABELLE II.21:  
*Mutagenese-PCR. Reagenzien und Reaktionsbedingungen*

Reagenz	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]	Dauer	T [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Zyklen
Wasser	40,0	2 min	95	16
10x Pfu-Puffer + $\text{MgSO}_4$	5,0	30 sek	95	
Primer 1 [125 ng/pro Ansatz]	0,5	60 sek	55	
Primer 2 [125 ng/pro Ansatz]	0,5	10 min	68	
dNTP-Mix [5mM]	2,0	$\infty$	10	
PfuTurbo DNA-Polymerase [2.5 U/ $\mu\text{L}$ ]	1,0			
	49,0			
Plasmid-DNA [5-50 ng/ $\mu\text{L}$ ]	1,0			
50 $\mu\text{L}$ Gesamtvolumen	50,0			

### DpnI-Spaltung

Im Anschluß an die Mutagenese-PCR wurde in einer zweiten Reaktion die nicht-mutierte Matrizen-DNA aus dem Ansatz entfernt. Hierfür macht man sich die Eigenschaft der Restriktionsendonuklease DpnI zunutze, die ausschließlich methylierte oder hemimethylierte DNA zu schneiden vermag. Da nach der PCR lediglich die in Bakterien erzeugte Matrizen-DNA in methylierter Form vorliegt, wird nur sie von diesem Enzym geschnitten, während die nicht-methylierte, mutierte DNA unversehrt bleibt. Die *E. coli* werden mit diesem Ansatz transformiert, in dem mittels des bakterieneigenen Reparatursystems die durch zahlreiche Strangbrüche gekennzeichnete Matrizen-DNA ersetzt wird und die verbleibenden Einzelstrangbrüche beseitigt wurden. Aus den Bakterien lässt sich danach das Plasmid mit der mutierten Sequenz isolieren.

Direkt im Anschluss an die PCR, unmittelbar nach Erreichen der Endtemperatur von 37  $^{\circ}\text{C}$  wurde dem Mutagenese-PCR-Mix 1  $\mu\text{L}$  DpnI (10 Unit/ $\mu\text{L}$ ) zugegeben und der Ansatz ca. 1 h bei 37  $^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

*E. coli*-Zellen wurden mit 5  $\mu\text{L}$  des Ansatzes nach dem bereits beschriebenen Protokoll transformiert (Kapitel II.2.3.3).

### **II.2.8 FACS-Analyse**

Nach Markierung des gewünschten Phänotyp-spezifischen Markers mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper, erlaubt die Durchflusszytometrie das Zählen und die Charakterisierung von physikalischen und molekularen Eigenschaften von bestimmten Zellen in einer gemischten Zellpopulation. In einem Flüssigkeitsstrom können dadurch Oberflächenmoleküle sowie intrazelluläre Proteine quantitativ bestimmt werden. Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung wie an einer Perlenkette an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Dieses Argon-Laserlicht führt zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe, die wiederum Fluoreszenzlicht emittieren. Die emittierten Fluoreszenzen können durch verschiedene Photozellen detektiert werden.

Dazu wurden  $5 \times 10^5$  Zellen vor der Markierung in 500  $\mu$ L FACS-Puffer zur Blockierung unspezifischer Bindungen für 10 min bei RT mit Fc-Block inkubiert. Dann werden die zellspezifischen monoklonalen Antikörper in 200  $\mu$ L FACS-Puffer für 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer (je 5 mL, 5 min bei 300xg, 4 °C) gewaschen und sedimentiert. Für die Analyse ins FACScan wird das Sediment in 200-300  $\mu$ L FACS-Puffer aufgenommen. Zur Quantifizierung werden wenn möglich 10.000 Zellen aufgenommen. Die Analyse erfolgt mit der CellQuest-Software (Version 4.0). Es wurden die folgenden Antikörper anti-CD3, anti-CD4, anti-CD28, anti-CD45RA, anti-CD19 und anti-CD45RO MAks, sowie FITC oder PE konjugierte Farbstoffe eingesetzt.

### **II.2.9 Phylogenetische Analyse**

Der Verwendung molekularer Sequenzen für phylogenetische Studien basiert auf der Annahme, dass Veränderungen in der DNA-Sequenz zufällig und zeitabhängig auftreten und ein Teil davon in den Molekülen dauerhaft erhalten bleibt. Die Akkumulation solcher Mutationen läuft jedoch nicht in allen Genomabschnitten gleich schnell ab. Genomabschnitte hoher Mutationsraten, eignen sich zur Analyse relativ junger Ereignisse, während Genomabschnitte mit langsamer Mutationsrate für die Analyse weiter zurückliegender Ereignisse herangezogen werden können. Die Einordnung der untersuchten YF-Fälle in einen Stammbaum wurde mit Hilfe von Megalign (Lasergene) oder PHYLIP (PHYLogeny Inference

Package) durchgeführt. Es wurden Alignments mit Referenzsequenzen aus einer Datenbank (National Center for Biotechnology Information NCBI) und den zu untersuchenden YFV-Abschnitten erstellt. Eine Distanzmatrix und ein Stammbaum wurde mit dem „Neighbourjoining“-Verfahren erstellt (ClustalW, Phylogenetic Tree).

## II.2.10 Klassifikation der Impfwisfenfälle (YEL-AE) nach YFV 17D-Impfung

Da der YFV 17D-Impfstoff nicht zwangsläufig mit Impfwisfenfällen korreliert werden kann, sind in Tabelle II.22 und Tabelle II.23 die Kriterien für das Vorliegen eines YEL-AVD- bzw. YEL-AND-Falles aufgelistet.

TABELLE II.22:  
*Schwere der Impfwisfenfälle (YEL-AVD) nach YFV-Impfung und Fall-Definition*

<b>Symptome</b>	
<b>Level 1 Viszerotrope Erkrankung</b>	Fieber ( $\geq 38^{\circ}\text{C}$ , Dauer $> 24$ h), UND einer oder mehrere der folgenden Symptome: <ul style="list-style-type: none"> <li>· Übelkeit, Brechreiz</li> <li>· Erbrechen</li> <li>· Malaise (Dauer <math>&gt; 72</math> h)</li> <li>· Muskelschmerzen (Dauer <math>&gt; 24</math> h)</li> <li>· Gelenkschmerzen (Dauer <math>&gt; 24</math> h)</li> <li>· Atemnot</li> </ul>
<b>Level 2 Viszerotrope Erkrankung</b>	Level 1 viscerotroper Erkrankung UND einer oder mehrere der folgenden Symptome: <ul style="list-style-type: none"> <li>· Gelbsucht (Totaler Bilirubin-Wert um 1,5-fach vom Referenzwert erhöht)</li> <li>· Leberdisfunktion (Erhöhung von GOT und GPT 3-fach erhöht)</li> <li>· Nierenbeeinträchtigung (Abfall der glomerulären Filtrationsrate, gemessen an der Erhöhung (<math>&gt; 1,5</math>-fach) des BUN und Kreatinin Wertes und keiner Nierenkrankengeschichte)</li> <li>· Tachykardie (Herzfrequenz <math>&gt; 100</math> Schläge pro Minute) oder Bradykardie (<math>&lt; 50</math> Schläge pro Minute)</li> <li>· Rhabdomyolyse (<math>&gt; 5</math>-fach des normalen Creatine Phosphokinase -Wertes)</li> <li>· akutes Atemnotsyndrom</li> <li>· Thrombozytopenie (Thrombozyten <math>&lt; 100.000/\mu\text{L}</math>)</li> <li>· Hypotonie</li> <li>· Myokarditis</li> <li>· Disseminierte intravaskuläre Koagulation (Erhöhung der Prothrombin Zeit oder aktivierte partielle Thromboplastin Zeit mit Fibrinabbauprodukten)</li> <li>· Hämorrhagien</li> </ul>
<b>YEL-AVD</b>	
<b>Verdächtig</b> (alle Punkte müssen erfüllt sein)	Beginn der Symptome innerhalb 1-10 Tage nach Gelbfieberimpfung, die entweder alleine oder in Kombination mit anderen Impfstoffen vergeben wurde Level 2 viscerotroper Erkrankung, mit einem Indiz einer Leberdisfunktion Keine andere Diagnose
<b>Wahrscheinlich</b> (verdächtig YEL-AVD und einer oder mehrere der folgenden Punkte)	Histopathologie consistent mit YFV-Infektion (z.B. Leber-Nekrosen, Councilman Bodies: Milchglashepatozyten) YFV 17D* Isolation aus dem Blut ( $> 7$ dpv) YFV 17D* Virus Konzentration im Serum überschreitet 3 log <sub>10</sub> PFU/mL
<b>Sicher</b> (verdächtig YEL-AVD und einer oder mehrere der folgenden Punkte)	YFV spezifisches Antigen im Gewebe mittels Immunohistochemie nachgewiesen YFV 17D* Virus Isolation aus dem Gewebe Amplifikation von YFV 17D* aus dem Gewebe

\* bestätigt als YFV 17D mittels MAK-Analyse oder durch Nukleinsäure-Sequenzierung

TABELLE II.23:  
Schwere der Impfzwischenfälle nach YFV-Impfung (YEL-AND) und Fall-Definition

<b>Symptome</b>	
<b>Level 1 Neurotrope Erkrankung</b>	<p>Ein oder mehrere der folgenden Symptome:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>·Fieber (<math>\geq 38^{\circ}\text{C}</math>, Dauer <math>&gt; 24</math> h) und Kopfschmerzen (Dauer <math>&gt; 24</math> Stunden)</li> <li>·Zentralnervöse Disfunktion (eingeschlossen, aber nicht limitiert auf: Ataxie, Aphasie, und Paresis)</li> <li>·Mentale Status Veränderung (Konfusion, Lethargie, oder Persönlichkeitsänderungen <math>&gt; 24</math> Stunden)</li> <li>·Anfall neuer Symptome oder Wiederauftreten von zuvor kontrollierter Anfälle</li> <li>·CSF Pleozytosis (<math>\geq 5\text{WBC}/\text{mm}^3</math>)</li> <li>·erhöhtes CSF Protein (<math>&gt; 1,5</math> fach über dem Grenzwert)</li> </ul>
<b>Level 2 Neurotrope Erkrankung</b>	<p>Level 1 neurotrope Erkrankung UND einer oder mehrere der folgenden Symptome:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>·Neuroimaging konsistent mit Entzündung (mit oder ohne Demyelination)</li> <li>·EEG-Bild wie bei einer Enzephalopathie</li> </ul>
<b>YEL-AVD</b>	
<b>Verdächtig</b> (alle Punkte müssen erfüllt sein)	<p>Beginn der Symptome innerhalb 1 bis 30 days nach YFV 17D-Impfung, entweder als Einzelimpfung oder in Kombination mit anderen Impfstoffen</p> <p>Level 2 neurotroper Erkrankung</p> <p>Keine andere Diagnose</p>
<b>Wahrscheinlich</b> (verdächtiger YEL-AND und einer oder mehrere der folgenden Punkte)	<p>verdächtiger YEL-AND UND einer oder mehrere der folgenden Dinge:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>·YFV 17D*-Isolation aus dem Blut (<math>&gt; 7</math> dpv)</li> <li>·YFV 17D* virus Konzentration im Serum übersteigt <math>3 \log_{10}</math> pfu/mL</li> </ul>
<b>Sicher</b> (verdächtiger YEL-AND und einer oder mehrere der folgenden Punkte)	<p>verdächtiger YEL-AND UND einer oder mehrere der folgenden Zeichen:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>·YF spezifische CSF IgM</li> <li>·YFV 17D* virus Isolation aus CSF</li> <li>·Amplifikation des Impfstoffvirus aus CSF</li> </ul>

\* bestätigt als YFV 17D mittels MAK-Analyse oder durch Nukleinsäure-Sequenzierung

Das Nichtvorhandensein eines Einschlusskriteriums schließt eine YEL-AE-Diagnose nicht unbedingt aus, aber andere Diagnosen, die laboratorische bestätigt werden können, mögen ausreichend sein um YEL-AE auszuschließen.