

3. METHODEN

3.1 DNA-Rekombinationstechniken

3.1.1 Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen vom Typ II erkennen spezifisch eine Sequenz von vier bis acht Basen im DNA-Doppelstrang (seltener schneiden Restriktionsendonukleasen auch einzelsträngige DNA) und schneiden beide Stränge des Duplex an jeweils einer Phosphodiesterbindung, zumeist innerhalb eines Palindroms. Dabei entstehen enzymabhängig entweder glatte oder einzelsträngige 3'- bzw. 5'-überstehende Enden.

Die Restriktionsreaktionen wurden unter den vom Hersteller empfohlenen Puffer- und Reaktionsbedingungen durchgeführt. Das Volumen des enzymespezifischen Puffers betrug in allen Fällen 1/10 des Gesamtvolumens des Reaktionsansatzes, die eingesetzte Enzymmenge variierte zwischen 2 und 10 Units/ μg DNA. Bei speziellen Restriktionsenzymen und bei Einsatz zweier unterschiedlicher Restriktionsenzyme im gleichen Reaktionsansatz wurde der Reaktionsansatz durch Zugabe von 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA supplementiert. Die Inkubation erfolgte in der Regel für 1 h bei 37°C im Wasserbad. Die Vollständigkeit des Verdaus wurde nachfolgend über Agarosegelelektrophorese (Kap. 3.3) überprüft. Anschließend wurde der Restriktionsansatz aufgereinigt (Kap. 3.4.2), um den ungestörten Ablauf nachfolgender Reaktionen zu gewährleisten. Sollten bestimmte DNA-Fragmente isoliert werden, so wurden diese im Anschluss an die Agarosegelelektrophorese aus dem Gel extrahiert (Kap. 3.4.1).

3.1.2 Ligation von DNA-Fragmenten

In einer durch die T4-DNA-Ligase katalysierten Reaktion können unter ATP-Verbrauch kompatible Enden doppelsträngiger DNA-Fragmente durch Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppen verknüpft werden.

Anwendung fand die Ligation zweier DNA-Moleküle in der Verknüpfung eines DNA-Fragments mit einem linearisierten Vektor. Der Reaktionsansatz enthielt Insert- und Vektor-DNA in einem molaren Verhältnis von 1:4, 5 Units T4-DNA-Ligase und 1/10 des Gesamtvolumens T4-DNA-Ligasepuffer. Die Ligation kompatibler kohäsiver Enden erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur (RT), die Ligation stumpfer Enden hingegen über Nacht bei 16°C im Thermocycler.

3.1.3 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um im Falle einer ungerichteten Klonierung die Religation des eingesetzten linearisierten Vektors zu verhindern, wurden die endständigen 5'-Phosphatgruppen durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase aus Kälberserum abgespalten.

Die aus dem Agarosegel extrahierte (Kap. 3.4.1) Vektor-DNA wurde in NEB-Puffer 3 mit 0,5 Units/ μ g DNA alkalischer Phosphatase für 60 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die dephosphorylierte DNA wurde nachfolgend über eine Silikagelmembran aufgereinigt (Kap. 3.4.2) und in der Ligationsreaktion (Kap. 3.1.2) eingesetzt.

3.1.4 Phosphorylierung von DNA-Fragmenten

Oligonukleotide, welche ein Teilfragment des circoviralen Replikationsorigins repräsentieren (Anhang A.6), wurden kommerziell bezogen und waren nicht phosphoryliert. In einigen Fällen erfolgte die Phosphorylierung in einer durch die T4-Polynukleotid-Kinase katalysierten Reaktion durch die Übertragung der endständigen γ -Phosphatgruppe von ATP auf das 5'-Hydroxyende der entsprechenden Oligonukleotide.

In einem 50 μ l Reaktionsansatz wurden 300 pmol DNA, 5 μ l T4-DNA-Ligasepuffer (10x) und 10 Units T4-Polynukleotid-Kinase für 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung des Enzyms für 20 min bei 65°C gestoppt und die DNA bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

3.1.5 Erzeugung glatter DNA-Enden nach Restriktionsverdau

Um zwei DNA-Fragmente mit nicht kompatiblen Enden miteinander zu verknüpfen, wurden die kohäsiven Enden in einer durch die T4-DNA-Polymerase katalysierten Reaktion geglättet. Das Enzym besitzt sowohl eine 5'-3'-Polymerase- als auch eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, d.h. überstehende 5'-Enden werden aufgefüllt, überstehende 3'-Enden werden abgespalten. Die DNA-Lösung wurde mit T4-DNA-Ligasepuffer (10x), 100 µM dNTPs und 1 Unit T4-DNA-Polymerase/µg DNA versetzt und für 15 min bei 12°C im Thermocycler inkubiert. Im Anschluss wurde die DNA über eine Silikagelmembran aufgereinigt (Kap. 3.4.2).

3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Durch die Polymerasekettenreaktion (132), eine enzymatische Methode für die *in vitro* Amplifikation von DNA-Molekülen, können kleinste Mengen genetischen Materials angereichert werden. Die Spezifität der Amplifikation wird durch zwei sequenzspezifische Oligonukleotide (Primer) gewährleistet, die nach der Denaturierung der DNA an die ihnen komplementären Stränge binden. Die von den Primern flankierte Zielsequenz wird durch eine thermostabile DNA-Polymerase dupliziert. Durch aufeinanderfolgende Zyklen der Denaturierung der DNA-Stränge, Anlagerung (Annealing) der Primer und DNA-Synthese (Elongation) wird eine exponentielle Vermehrung des gewünschten DNA-Fragments erreicht. Am Ende der PCR enthält das Reaktionsgemisch nach n Runden bzw. Zyklen ein theoretisches Maximum von 2^n doppelsträngigen DNA-Molekülen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Enzymgemisch aus hitzestabiler *Taq*-DNA-Polymerase und *Tgo*-DNA-Polymerase (Expand High Fidelity PCR System) verwendet. Letztere besitzt eine Korrekturlesefunktion, wodurch der Einbau fehlerhafter Nukleotide in die neu synthetisierte DNA minimiert wird. Die Reaktionsbedingungen wurden entsprechend den Empfehlungen des Herstellers eingestellt. In einem Volumen von 25 µl wurden 10 ng Plasmid-DNA, jeweils 10 µM der Primerlösungen und ddH₂O gemischt und mit 25 µl High Fidelity PCR Master vereinigt. Nachfolgend wurde die PCR im Thermocycler gestartet. Die separierte Präparation und spätere Vereinigung der Ansätze verhindert eine vorzeitige Interaktion der *Tgo*-DNA-Polymerase mit den Primern bzw. dem Template, was in einer partiellen Degradation der DNA durch die Polymerase eigene 3'-5'-Exonukleaseaktivität

(Korrekturlesefunktion) resultieren könnte. Das Temperaturprofil sowie die Reaktionszeiten der einzelnen Schritte der PCR wurden in Abhängigkeit von der Schmelztemperatur (T_m -Wert) der eingesetzten Primer (Anhang A.5) und der Länge der zu amplifizierenden DNA gewählt.

	Temp.	Dauer	
Denaturierung	94°C	2 min	
Denaturierung	94°C	15 sec	30 Zyklen
Primerhybridisierung	50-60°C	30 sec	
Kettenverlängerung	72°C	45 sec	
abschließender Syntheseschritt	72°C	7 min	
Lagerung	4°C	∞	

Um die Größe und die Reinheit der amplifizierten PCR-Produkte zu kontrollieren, wurden diese im Anschluss über Agarosegelelektrophorese (Kap. 3.3) aufgetrennt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die PCR-Ansätze bei 4°C gelagert.

3.3 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Standardmethode zur Auftrennung und Identifikation von Nukleinsäuren.

Abhängig von der erwarteten Fragmentgröße wurden 0,8 - 2,0%ige Agarosegele verwendet. Hierzu wurde die Agarose in TBE-Puffer (2x) durch Erhitzen vollständig gelöst und anschließend auf ca. 56°C abgekühlt bevor das Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,4 µg/ml zugesetzt wurde. Die Gele wurden nachfolgend mit geeigneter Taschengröße in einer horizontalen Gelkammer gegossen. Vor dem Auftrag wurden die Proben mit 1/10 Volumen DNA-Probenpuffer versetzt und gut durchmischt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mit TBE als Laufpuffer (2x) bei konstanter Spannung (~ 100 mA).

3.4 Aufreinigung von Nukleinsäurefragmenten

Um gewünschte DNA-Moleküle von anderen Nukleinsäuren, Proteinen und Salzen zu befreien, die spätere Reaktionen negativ beeinflussen könnten, kommen je nach Beschaffenheit der DNA und ihrer Fragmentlänge unterschiedliche Methoden zur Anwendung.

3.4.1 Isolierung aus Agarosegelen

Die Aufreinigung gewünschter DNA-Moleküle erfolgte nach der Auftrennung in einem 1%igen Agarosegel (Kap. 3.3) über das QIAquick Gel Extraction Kit. Extraktion und Aufreinigung der DNA-Fragmente basiert dabei auf der Löslichkeit von Agarose und selektiver Adsorption von Nukleinsäuren (bis zu 10 µg) an eine Silikagelmembran in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen, während andere Bestandteile die Membran ungebunden passieren.

Nach der Elektrophorese wurde das zu isolierende DNA-Fragment unter UV-Licht ausgeschnitten, mit dem dreifachen Volumen Puffer QG versetzt (100 mg \approx 100 µl) und bei 50°C im Wasserbad bis zum vollständigen Schmelzen der Agarose inkubiert. Der Puffer QG stellt die für die Bindung der DNA an die Silikagelmembran erforderlichen Bedingungen her. So erfolgt die DNA-Bindung einerseits in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen, ist jedoch andererseits pH-Wert abhängig. Die DNA-Adsorption wird bei pH-Werten $> 7,5$ drastisch reduziert, so dass der pH-Wert gegebenenfalls durch Zugabe von 10 µl 3M Natrium-Acetat-Lösung (pH 5,0) korrigiert werden muss, um die Adsorptionseffizienz nicht zu beeinträchtigen. Nach zehnminütiger Inkubation wurde die DNA-haltige Lösung über Zentrifugation (13000 UpM, 1 min, RT, Mikroliterrotor, Biofuge) in einer QIAquick-Säule an die Silikagelmembran gebunden.

Durch erneute Zugabe von 0,5 ml Puffer QG auf die Säule wurden Agaroserückstände entfernt. Das zweimalige Waschen mit ethanolhaltigem Puffer PE beseitigte Salzkontaminationen. Die Elution erfolgte bei niedrigen Salzkonzentrationen und in basischem Milieu durch Zugabe von 40 µl Puffer EB. Nach einer Inkubationszeit von 1 min bei RT wurde die DNA durch einen abschließenden Zentrifugationsschritt (13000 UpM, 1 min, RT, Mikroliterrotor, Biofuge) eluiert.

Zur Entfernung möglicher Erhanolrückstände wurden die Proben in der SpeedVac-Zentrifuge für 5 min evaporiert.

3.4.2 Aufreinigung über Silikagelmembranen

Die Aufreinigung sowohl der PCR-generierten Fragmente (Kap. 3.2) als auch der geschnittenen PCR-Produkte (Kap. 3.1.1) erfolgte über das QIAquick PCR Purification Kit. Die Methode ist nahezu identisch mit denen der Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (Kap. 3.4.1). Auch hier wird die aufzureinigende DNA in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen und bei pH-Werten $\leq 7,5$ an eine Silikagelmembran gebunden, gewaschen und anschließend im basischen Milieu mit geringen Salzkonzentrationen eluiert. Da jedoch keine Agarose beteiligt ist, wird anstelle des Puffers QG alternativ Puffer PB verwendet, um die erforderlichen Bedingungen herzustellen.

Im Anschluss an die PCR erfolgte die Zugabe des fünffachen Volumens Puffer PB zum Reaktionsgemisch. Nach Mischen wurde die Lösung über Zentrifugation (13000 UpM, 1 min, RT, Mikroliterrotor, Biofuge) in einer Mini-Zentrifugationssäule an die Silikagelmembran gebunden und nachfolgend mit 0,75 ml Puffer PE gewaschen, um Salzkontaminationen zu entfernen. Die Elution erfolgte nach Zugabe von 40 μ l Puffer EB durch Zentrifugation (13000 Upm, 1 min, RT, Mikroliterrotor, Biofuge).

Zur Entfernung möglicher Erhanolrückstände wurden die Proben in der SpeedVac-Zentrifuge für 5 min evaporiert.

3.4.3 Alkoholfällung

Durch Zugabe von Alkohol lässt sich, in Gegenwart hoher Konzentrationen monovalenter Kationen (0,2 - 2,5 M), DNA aus einer wässrigen Lösung präzipitieren. Anschließend wird die Nukleinsäure durch Zentrifugation pelletiert und durch Waschen mit 70 % Ethanol von überschüssigen Salzresten befreit. Es existieren dabei mehrere Varianten dieser Methode, welche sich in erster Linie hinsichtlich der verwendeten Salze und Alkohole unterscheiden. Standardmäßig werden NaAc (Endkonzentration 0,3 M) und Ethanol eingesetzt.

Die DNA-haltige Probenlösung wurde mit 1/10 Volumen 3 M NaAc (pH 4,6) versetzt. Nach Zugabe des 2,5fachen Volumens Ethanol p.a. und Zentrifugation (15000 Upm, 1 h, 4°C,

GSA-Rotor, Sorvall) wurde das Pellet mit 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 100 µl TE-Puffer resuspendiert.

3.4.4 Phenol/Chloroform-Extraktion

Um Nukleinsäurelösungen von proteinhaltigen Verunreinigungen zu befreien, wurde die Nukleinsäurepräparation mit einem Gemisch aus Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1, v/v) ausgeschüttelt. Phenol und Chloroform besitzen eine denaturierende Wirkung auf Proteine, welche in der Grenzschicht zwischen wässriger Nukleinsäurelösung und organischer Phase ausfallen oder sich in der Phenolphase lösen. Chloroform stabilisiert dabei die instabile Phasengrenze, Isoamylalkohol wiederum wirkt einem Aufschäumen während des Mischvorganges entgegen. Eine Phasentrennung nach dem Ausschütteln wird durch Zentrifugation beschleunigt.

Die DNA-haltige Probenlösung wurde mit einem Volumenäquivalent Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1, v/v) versetzt, durch Vortexen gemischt und zentrifugiert (13000 Upm, 3 min, RT, Mikroliterrotor, Biofuge) zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und die DNA durch Alkoholfällung präzipitiert (Kap. 3.4.3).

3.5 DNA-Transfer in Bakterien

3.5.1 Transformation chemisch kompetenter Bakterienzellen

Die Transformation (25, 51) Z-kompetenter Bakterienzellen (Kap. 3.6) erfolgte in einem Volumen von 100 µl. Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 100 ng vorgekühlter Plasmid-DNA gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Im Falle einer Ampicillin-Resistenz der eingesetzten Plasmid-DNA wurde der gesamte Transformationsansatz, gegebenenfalls zusammen mit 20 µl X-GAL-Lösung (20 mg/ml) und 4 µl IPTG-Lösung (1 M), auf Selektionsmedium ausplattiert. Bei anderer Antibiotikaresistenz erfolgte vor dem Ausplattieren eine einstündige Vorinkubation bei 37°C und 200 UpM auf dem Schüttler, um die Regeneration der Bakterienzellwand und die Ausprägung der erforderlichen Resistenz zu

gewährleisten. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C im Brutschrank wurden die Agarplatten bei 4°C gelagert.

3.5.2 Transformation elektrokompenter Bakterienzellen

Die Transformation erfolgte in einem Volumen von 20 µl DH10B™ ElectroMAX Competent Cells. Die verwendeten Eppendorfgefäße und Pipettenspitzen wurden bei -20°C, die DNA und die Küvetten auf Eis vorgekühlt. Nach Auftauen der Zellen auf Eis und Mischen mit 1 µl (100 ng/µl) DNA wurde der Transformationsansatz vollständig in Elektroporationsküvetten (0,1 cm) überführt. Die Elektroporation erfolgte mit einem Gene Pulser™ mit 25 µF, 1,8 KV und 200 Ω. Die Zellen wurden in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37°C und 200 UpM auf dem Schüttler inkubiert.

3.6 Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen

Für alle Klonierungen wurde der *E. coli*-Stamm DH5α verwendet. Dieser Stamm ist in seinen Rekombinationseigenschaften defekt (*recA*), was die Stabilität eingeschleuster Plasmid-DNA erheblich erhöht. Ferner ist er in seinen Restriktionssystemen defizient (*mcrA*, *mcrB*, *mmr*), wodurch die Transformationseffizienz deutlich gesteigert wird. Voraussetzung für die Aufnahme von DNA ist, dass die Zellen sich im Zustand der Kompetenz befinden, wobei die Transformationseffizienz entscheidend vom Kompetenzgrad der Rezipienten abhängig ist.

Für die Präparation kompetenter Bakterienzellen wurden 50 ml SOB-Medium mit einem Inokulum von 0,5 ml einer gut gewachsenen Übernachtskultur in einem 500 ml Erlenmeyerkolben mit Schikane beimpft und über Nacht bei 25°C und 200 UpM auf dem Schüttler inkubiert. Nach Erreichen einer optischen Dichte OD₅₈₈ von 0,4-0,6 wurden die Zellen für 10 min auf Eis gekühlt und in vorgekühlten Greiner Röhrchen pelletiert (8000 Upm, 10 min, 4°C, TTH-750, Multifuge) pelletiert. Die Pellets wurden in jeweils 5 ml eisgekühltem Waschpuffer (1x) resuspendiert und erneut pelletiert (s.o.). Nach Resuspendieren der Pellets in eisgekühltem Kompetenzpuffer (1x) wurden die Zellen zu jeweils 100 µl in vorgekühlten Eppendorfgefäße aliquotiert und bei -70°C gelagert.

3.7 Präparation von Plasmid-DNA

Durch den Einsatz von Plasmiden lässt sich rekombinante DNA einfach und effizient vermehren. In Abhängigkeit vom Volumen der angesetzten Bakterienkultur wurden die im Folgenden beschriebenen Präparationen durchgeführt.

3.7.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Minilysaten

Sollte die DNA einer Vielzahl von Transformanten über Restriktionsverdau (Kap. 3.1.1) und Agarosegelelektrophorese (Kap. 3.3) untersucht werden, erfolgte die Präparation der Plasmid-DNA über ein kombiniertes Verfahren aus alkalischer Lyse und anschließender Ethanolpräzipitation. Für folgende Sequenzanalysen musste die präzipitierte DNA zusätzlich einer Aufreinigung über eine Silikagelmembran (Kap. 3.4.2) unterzogen werden.

Die Anzucht aus einer transformierten Einzelkolonie erfolgte über Nacht bei 37°C in 5 ml LB-Flüssigmedium unter entsprechendem Selektionsdruck. Nach Pelletieren von 2 ml Bakterienkultur (8000 UpM, 10 min, 4°C, Mikroliterrotor, Biofuge) wurden die Zellpellets in 100 µl Puffer P1 resuspendiert. Die alkalische Lyse erfolgte durch Zugabe von 100 µl Puffer P2 und nachfolgender Inkubation für 5 min bei RT. Die Zugabe von 100 µl Puffer N3 führte zur Präzipitation denaturierter Proteine, chromosomaler DNA und Zelltrümmer als Salz-Detergens-Komplexe. Nach einem Zentrifugationsschritt (13000 Upm, 10 min, 4°C, Mikroliterrotor, Biofuge) wurde der Überstand abgenommen und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 600 µl Ethanol p.a. präzipitiert. Nach erneuter Zentrifugation (s.o.) wurden die Pellets mit 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 100 µl TE-Puffer resuspendiert.

3.7.2 Präparation von Plasmid-DNA über Silikagelmembranen

Die Isolierung von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab wurde mit dem QIAprep 8 Miniprep Kit durchgeführt. Die Methode basiert auf einer modifizierten alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (11) sowie einer anschließenden Adsorption der DNA an eine Silikagelmembran in Gegenwart hoher Konzentrationen chaotroper Salze bei einem pH ≤ 7,5. Die Anzucht aus einer transformierten Einzelkolonie erfolgte über Nacht bei 37°C in 5 ml LB-Flüssigmedium unter entsprechendem Selektionsdruck. Nach Zentrifugation (8000 UpM,

10 min, RT, TTH-750-Rotor, Multifuge) wurde das Zellpellet in 250 µl RNase haltigem Puffer P1 resuspendiert. Die alkalische Lyse und damit die Freisetzung der Plasmid-DNA erfolgte durch Mischen mit 250 µl SDS- und NaOH-haltigem Puffer P2 und fünfminütige Inkubation bei RT. SDS ist dabei für die Lösung der Phospholipid- und Protein-Komponenten der Zellmembran verantwortlich, was letztendlich in der Lyse der Bakterienzelle resultiert. Das NaOH hingegen wird für die Denaturierung sowohl chromosomaler und Plasmid-DNA als auch der Proteine benötigt. Die Zugabe von 500 µl Puffer N3 führte zur Präzipitation denaturierter Proteine, chromosomaler DNA und Zelltrümmer als Salz-Detergens-Komplexe. Nach einem Zentrifugationsschritt (13000 Upm, 10 min, RT, Mikroliterrotor, Biofuge) wurde der Überstand abgenommen und direkt auf QIAprep 8 Säulen gegeben, welche zuvor in einer Vakuumapparatur (QIAvac 6S) installiert worden waren. Nach Anlegen des Vakuums adsorbiert die Plasmid-DNA an die Membran, während zelluläre Proteine und Metaboliten ungebunden passieren. Schwache Bindung von RNA wird durch Aktivität der RNase in Puffer P1 inhibiert. Durch zwei aufeinanderfolgende Waschschrte mit jeweils 1 ml ethanolhaltigem Puffer PE wurde die DNA auf der Membran von Salzen befreit und nachfolgend mit 150 µl Niedrigsalzpuffer EB bei $\text{pH} \geq 8$ eluiert. Zur Entfernung möglicher Ethanolrückstände wurden die Proben in der SpeedVac-Zentrifuge für 5 min evaporiert. Die Konzentrationsbestimmung der präparierten Plasmid-DNA erfolgte fluorometrisch (Kap. 3.9.2) oder über Agarosegelelektrophorese (Kap. 3.9.1).

3.7.3 Präparation von Plasmid-DNA über Anionenaustauschersäulen

Präparationen größerer Mengen an Plasmid-DNA wurden mit Hilfe des Plasmid Maxi Kit durchgeführt. Die Isolierung basiert, wie bereits unter 3.7.2 beschrieben, auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Die Plasmid-DNA wird hierbei unter Niedrigsalzbedingungen und bei pH-Werten von 5,5 an eine Anionenaustauschersäule gebunden, gewaschen und anschließend unter Hochsalzbedingungen eluiert.

Die Anzucht der Bakterienkulturen erfolgte über Nacht in 200 ml LB-Flüssigmedium unter entsprechendem Selektionsdruck bei 37°C und 200 UpM auf dem Schüttler. Nach Pelletieren der Bakterien (8000 Upm, 15 min, 4°C, SS-34-Rotor, Sorvall) wurde der Überstand dekantiert und das Bakterienpellet in 10 ml Puffer P1 resuspendiert. Es folgte die Lyse durch vorsichtiges Mischen mit 10 ml Puffer P2 und fünfminütige Inkubation bei RT. Das Lysat wurde mit 10 ml Puffer P3 neutralisiert, wobei eine fünfzehnminütige Inkubation auf Eis die Präzipitation der Salz-Detergens-Komplexe beschleunigen sollte. Nach Zentrifugation (11000

Upm, 30 min, 4°C, GSA-Rotor, Sorvall) wurde der Plasmid-DNA enthaltende Überstand abgenommen und auf eine QIAGEN-Säule (QIAGEN-tip 500) gegeben, welche zuvor mit 10 ml Puffer QBT äquilibriert worden war (das enthaltene Detergens Triton X-100 bewirkt eine Reduktion der Oberflächenspannung und damit den Durchfluss ohne Anlegen eines Druckes oder Vakuums). Die gebundene DNA wurde durch zwei aufeinanderfolgende Waschschrte mit jeweils 30 ml Puffer QC von RNA, Proteinen und Metaboliten befreit. Die Elution erfolgte im Anschluss durch Applikation von 15 ml Puffer QF in Gegenwart hoher Salzkonzentration. Durch Zugabe von 100%igem Isopropanol (0,7 Volumeneinheiten) p.a. wurde die DNA präzipitiert, anschließend pelletiert (11000 Upm, 30 min, 4°C, GSA-Rotor, Sorvall), mit 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen und nach Trocknen an der Luft in 0,5 ml Puffer EB aufgenommen.

Die Konzentrationsbestimmung der präparierten Plasmid-DNA erfolgte fluorometrisch (Kap. 3.9.2) oder über Agarosegelelektrophorese (Kap. 3.9.1).

3.8 Verfielfältigung von Plasmid-cDNA-Bibliotheken

Die Expansion der Plasmid-cDNA-Bibliothek erfolgte über die so genannte *semi solid* Amplifizierung primärer cDNA-Transformanten (78).

In einem 500 ml Erlenmeyerkolben wurden 1,35 g SeaPrep Agarose unter ständigem Rühren auf dem Magnetprüher sukzessive mit 450 ml LB (2x) versetzt. Nach Autoklavieren für 30 min bei 121°C, Abkühlen im Wasserbad auf 37°C und Zugabe des Antibiotikums (200 µg/ml) erfolgte die Zugabe von 4×10^5 - 6×10^5 primärer cDNA-Transformanten und nachfolgendes Mischen für 2 min auf dem Magnetprüher. Nach Abkühlen im Eiswasserbad (1 h) wurden die Kulturen für 40-45 h bei 30°C im Brutraum erschütterungsfrei inkubiert, wobei die Inkubation bei 30°C zur Stabilisierung unstabiler Klone beitragen sollte (52). Nach Zentrifugation für 20 min bei 10000 g und RT wurden die Pellets in einem Gesamtvolumen von 100 ml sterilem LB-Glycerol (2x) resuspendiert, zu jeweils 10 ml aliquotiert und bei -70°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte über Anionenaustauschersäulen (Kap. 3.7.3).

3.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

3.9.1 Konzentrationsbestimmung über Agarosegelelektrophorese

Die Möglichkeit der optischen Quantifizierung von Nukleinsäuren eröffnet das Agarosegel. Anhand eines Standards bekannter DNA-Konzentration lässt sich nach elektrophoretischer Auftrennung durch Vergleich der Bandenintensitäten die DNA-Konzentration der Probenlösung abschätzen. Die Nachweisgrenze liegt hierbei in einer Größenordnung von ~ 5 ng.

Zu diesem Zwecke wurden 5,0 µl Probenlösung mit 3,0 µl TE-Puffer und 1,0 µl Probenpuffer vermischt. Als Standard bekannter DNA-Konzentration wurden 3,0 µl HindIII geschnittene DNA des Phagen λ mit 3,0 µl HaeIII geschnittener DNA des Phagen ϕ X174, 3,0 µl TE-Puffer und 1,0 µl Probenpuffer vermischt und zusammen mit der Probenlösung über ein 1%iges Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Kap. 3.3)

3.9.2 Fluorometrische Bestimmung

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration erfolgt in diesem Fall mit Hilfe eines DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffes (H 33258), der nur geringe Affinität zu RNA und Proteinen besitzt. Durch selektive Bindung an DNA ändert der Fluoreszenzfarbstoff seine sterische Konformation. Nach Anregung bei 365 nm wird die emittierte Fluoreszenz bei 460 nm gemessen. Je nach Farbstoffkonzentration lassen sich DNA-Mengen von 10 bis 2000 ng/µl bestimmen.

Die Kalibrierung des Fluorometers erfolgte in Abhängigkeit des erwarteten Konzentrationsbereichs der Probenlösung mit Kalbsthymus-DNA einer Konzentration von 120 ng/µl in Lösung A bzw. 1200 ng/µl in Lösung B. Für die Messung wurden 2 µl Probenlösung bzw. DNA-Standard in 2 ml Messlösung in geeigneten Quarzküvetten gemischt.

3.10 Sequenzierung von Nukleinsäuren

Die Sequenzierung von Nukleinsäuren wurde in modifizierter Form nach der Didesoxy-Methode (133) durchgeführt. Diese Methode basiert auf DNA-Neusynthese durch DNA-Polymerasen, welche für ihre Funktion eine einzelsträngige Matrizen-DNA und einen Primer benötigen. Beim Sequenzierungsverfahren nach Sanger werden neben den üblichen Desoxynukleosidtriphosphaten so genannte Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTP: ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) verwendet, denen die Hydroxgruppe am 3'-C-Atom fehlt. Dies hat zur Folge, dass keine Phosphodiesterbindung zwischen dem Ende des wachsenden Strangs und dem neu hinzukommenden Nukleotid ausgebildet werden kann, sofern es sich dabei um ein Desoxynukleotidanaloga (ddNTP) handelt. Die Kettenverlängerung bricht an dieser Stelle ab. Man bezeichnet die Didesoxy-Methode nach Sanger deshalb auch als Kettenabbruchmethode.

Im Falle der nichtradioaktiven Sequenzierung werden die vier ddNTPs mit jeweils unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen kovalent verknüpft. Nach elektrophoretischer Auftrennung der spezifisch markierten DNA-Fragmente, welche aufgrund der statistischen, basenspezifischen Kettenabbrüche in allen Längen gebildet werden, über Polyacrylamidgel- oder Kapillarelektrophorese, erfolgt eine Anregung der vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe über Laserabtastung. Die emittierten Farbsignale werden über Filter mit vier verschiedenen Wellenlängen in einen Photomultiplier geleitet und mit Hilfe eines Computers in die entsprechende Nukleotidsequenz übersetzt. Das Ergebnis der Sequenzierung wurde jeweils als Computerdatei erhalten.

Für die Sequenzierung wurde der ABIPRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit verwendet.

In einem Reaktionsvolumen von 10 µl wurden 300 ng Plasmid-DNA, 10 pmol des entsprechenden Primers, 1 µl Sequenzierungspuffer, 2 µl Premix und ddH₂O gemischt. Der Premix enthält die dNTPs, die vier unterschiedlich fluoreszenzmarkierten ddNTPs und die AmpliTaq DNA-Polymerase FS im geeigneten Reaktionspuffer. Die Sequenzierungsreaktion erfolgte unter nachstehenden Reaktionsbedingungen im Thermocycler.

	Temp.	Dauer	
Denaturierung	96°C	2 min	25 Zyklen
Denaturierung	96°C	10 sec	
Primerhybridisierung	55°C	5 sec	
Kettenverlängerung	60°C	4 min	
Lagerung	4°C	∞	

Die weitere Verarbeitung sowie die Auftrennung der Proben durch die Sequenzierautomaten 373A oder ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer erfolgte als Serviceleistung des Robert Koch-Instituts.

3.11 Native und Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

Dieses Verfahren ermöglicht die Trennung von Proteinen und anderer Makromoleküle aufgrund ihrer Eigenschaft, in einem elektrischen Feld zu wandern.

Als Trägermedium wird das Polymer Polyacrylamid verwendet. Es ist chemisch inert und lässt sich durch Polymerisation von Acrylamid und dem Quervernetzungsreagenz N,N'-Methylenbis-(acrylamid) herstellen.

Soll eine elektrophoretische Trennung von Proteinen aufgrund ihrer Masse erreicht werden, so wird unter denaturierenden Bedingungen gearbeitet. Die Gegenwart des Detergens, Natriumdodecylsulfat (engl.: sodium dodecyl sulfate, SDS) resultiert in der Auflösung der nicht kovalenten Wechselwirkungen, d.h. die Polypeptide werden denaturiert und eine Aggregation inhibiert. SDS bindet an die meisten Proteine in einem Umfang, der der molaren Masse des Proteins annähernd proportional ist: 1,4 g SDS pro 1g Protein, d.h. etwa ein SDS-Molekül pro zwei Aminosäurereste. Die große negative Ladung, die dabei auf das Protein übertragen wird, maskiert dessen eigentliche Ladung, so dass SDS-beladene Proteine nahezu identische Ladungs-Masse-Verhältnisse aufweisen. SDS vermag jedoch nicht die Disulfidbrücken aufzulösen, so dass erst unter reduzierenden Bedingungen, z.B. durch die Zugabe von β -Mercaptoethanol, eine vollständige Denaturierung erreicht wird.

Die Auflösung der einzelnen Proteinbanden kann durch die so genannte diskontinuierliche pH- oder Disc-Elektrophorese (80) deutlich verbessert werden. Diese Technik erfordert zwei Gelsysteme. Das Trenngel, in dem die Auftrennung stattfindet, wird mit einem kurzen (ca. 1

cm), großporigen Sammelgel überschichtet. Unterschiede im pH-Wert und der Konzentration beider Gele führen dazu, dass die Proteine im Sammelgel in enge Banden fokussiert werden, bevor die Auftrennung im Trenngel erfolgt. Voraussetzung ist hierbei die Anwesenheit einer schwachen Säure (üblicherweise handelt es sich dabei um Glycin) im Elektrophoresepuffer.

Zur Durchführung der SDS-PAGE wurden 15 µl Probenlösung mit 5 µl Probenpuffer gemischt und für 5 min bei 95°C im Wasserbad inkubiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einer vertikalen Elektrophoresekammer über ein denaturierendes Gelsystem mit einer Stromstärke von 15 mA im Sammelgel und 20 mA im Trenngel.

	Trenngel		Sammelgel	
	10 %		5 %	
Acrylamid/Bis-Acrylamid (30 % w/v)	10,00	ml	3,30	ml
Trenngelpuffer	7,50	ml		
Sammelgelpuffer			2,50	ml
ddH ₂ O	12,04	ml	13,64	ml
SDS (10 % w/v)	0,30	ml	0,20	ml
TEMED	0,04	ml	0,04	ml
APS (10 % w/v)	0,12	ml	0,12	ml

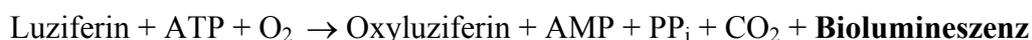
Zur Durchführung der nativen Polyacrylamidgelelektrophorese wurde die Probenlösung mit 2,5 µl Probenpuffer gemischt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einer vertikalen Elektrophoresekammer über ein nicht-denaturierendes Gelsystem mit einer Stromstärke von 15 mA pro Gel.

	Trenngel	
	5,5 %	
Acrylamid/Bis-Acrylamid (40 % w/v)	16,00	ml
TBE-Puffer (10x)	6,00	ml
ddH ₂ O	95,00	ml
Glycerol (87 % w/v)	1,50	ml
TEMED	0,09	ml
APS (10 % w/v)	0,90	ml

3.12 Replikationsassay

Als Replikon wird ein Abschnitt eukaryotischer DNA bezeichnet, welcher neben dem Replikationsorigin eine Sequenz trägt, welche die Termination der Replikation vermittelt. Der Replikationsorigin ist dabei das so genannte *in cis* aktive Kontrollelement, da es lediglich den DNA-Abschnitt beeinflusst, auf welchem es lokalisiert ist. Die *in trans* aktiven Replikationsfaktoren müssen nicht notwendigerweise auf demselben DNA-Abschnitt lokalisiert sein. Um Plasmidreplikation in eukaryotischen Zellen zu gewährleisten, müssen einerseits ein geeignetes *in cis* Kontrollelement andererseits die entsprechenden *in trans* aktiven Replikationsfaktoren zur Verfügung stehen.

Um die Replikationsaktivität der PCV1-Replikationsproteine gegenüber dem viralen Replikationsorigin zu untersuchen, wurden beide Kontrollelemente über Kotransfektion unterschiedlicher Plasmide (Kap. 3.13) in PK15-Zellen gebracht. Beide Plasmide tragen einen bakteriellen Replikationsorigin, um die Amplifizierung der Plasmid-DNA in Bakterien zu gewährleisten, aber kein Kontrollelement spezifisch für eukaryotische Replikation. Replikation in PK15-Zellen wird demzufolge lediglich durch die Anwesenheit des viralen Replikationsorigins gewährleistet, sofern die viralen Replikationsfaktoren zur Verfügung stehen. Quantifizierung der Replikation wird dabei über das Reportergen *luciferase (luc)* ermöglicht, welches auf dem Plasmid lokalisiert ist, welches auch den *in cis* aktiven Replikationsorigin trägt. Replikation des *luc*-Plasmids resultiert in einem Anstieg der Kopienzahl des *luc*-Gens und damit auch der Luziferaseaktivität. Luziferase, ein Enzym von 61 kDa, katalysiert in Gegenwart von molekularem Sauerstoff und unter ATP-Verbrauch die biolumineszente Oxidation von Luziferin zu Oxyluziferin.



Das beteiligte Enzym ist nur als vollständiges Produkt aktiv und bedarf für seine Aktivität keiner posttranslationalen Modifikationen. Die Quantifizierung der Lichtemission in den Zelllysaten ist somit ein indirektes Maß für die Rep/Rep' vermittelte Replikation des Reportergenplasmids in kotransfizierten PK15-Zellen.

Der eigentliche Luziferasenachweis erfolgte in einem Luminometer mit automatischer Injektion der Substratlösung.

Die Bestimmung der Reporterogenaktivität erfolgte über das Dual Light Kit in einem Luminometer. Das System erlaubt neben der Detektion der Luziferaseaktivität die nachfolgende Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität innerhalb des gleichen Zellextrakts, was der Normalisierung der Transfektionseffizienz dient.

Nach Transfektion (Kap. 3.13) mit den entsprechenden Plasmiden (Anhang A.7) wurden die PK15-Zellen 48 h bei 37°C im Brutschrank unter CO₂-Begasung inkubiert, wobei nach 24 h ein Mediumwechsel erfolgte. Nachfolgend wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und mit 100 μ l Lysispuffer versetzt. Nach Inkubation für 30 min bei -70°C und Auftauen wurden die Zellextrakte in vorgekühlte Eppendorfgefäße überführt und zentrifugiert (13000 UpM, 2 min, 4°C, Mikroliterrotor, Biofuge).

Die Überstände wurden mit Puffer A gemischt und nach Substratzugabe über Puffer B vermessen. Nach einer Inkubationszeit von 45 min wird die β -Galaktosidase/Galakton-Plus Substratreaktion durch Zugabe von Accelerator-II initiiert, welcher einerseits den pH-Wert erhöht (pH 9), andererseits den Lumineszenzenhancer zur Verfügung stellt. Verbleibende Luziferaseaktivität ist aufgrund des *quenching*-Effektes von Accelerator-II und des raschen kinetischen Verfalls der Reaktion minimal. Endogene Enzymaktivität (β -Galaktosidaseaktivität) wird unter den gegebenen Reaktionsbedingungen (pH 9) reduziert.

Nach Verdünnen des Substrats Galakton-Plus in Puffer B (1:100) wurde das Luminometer zunächst 50x mit ddH₂O und nachfolgend 50x mit Substratlösung gespült. In einer Mikrotiterplatte wurden 25 μ l Puffer A (RT) mit jeweils 10 μ l Zelllysate gemischt und sofort vermessen. Die Injektion der Substratlösung (100 μ l) erfolgte automatisch. Die Mikrotiterplatte wurde nachfolgend für 45 min im Dunkeln inkubiert und nach Spülen des Luminometers mit ddH₂O (50x) und Accelerator (50x) die β -Galaktosidaseaktivität in den Zelllysaten durch automatische Injektion des Accelerators (100 μ l) bestimmt.

3.13 DNA-Transfer in eukaryotische Zellen

Die transiente Transfektion eukaryotischer Zellen erfolgte mit Hilfe des kationischen nicht-liposomalen Lipides Effectene nach den Angaben des Herstellers. Durch Interaktion der negativen Phosphatgruppen mit dem positiv geladenen Enhancer in einem geeigneten Puffersystem wird die DNA zunächst in einen stark kondensierten Zustand überführt. Anschließend wird die kondensierte DNA nach Zugabe des Transfektionsreagenzes unter

Ausbildung von Mizellstrukturen von dem kationischen nicht-liposomalen Lipid umhüllt. Die DNA wird durch Endozytose des Effectene-DNA-Komplexes von der Zelle aufgenommen. Die Transfektion von PK15-Zellen wurde direkt in den verwendeten Kulturschalen bei 70-80 % konfluent gewachsenem Zellrasen durchgeführt, wobei die Menge der eingesetzten Transfektionsreagenzien von der Größe der verwendeten Kulturschalen abhängig war. Die zu transfizierende DNA wurde mit EC-Puffer und Enhancer gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von Effectene wurde der Transfektionsansatz durch Vortexen gemischt (10 sec) und für weitere 10 min bei RT inkubiert. Sowohl der mit PBS gewaschene Zellrasen als auch der Transfektionsansatz wurden mit frischem DMEM-Medium mit 5 % FKS versetzt und letzterer zu den Zellen gegeben. Die Inkubation der Zellen mit dem DNA-Lipidkomplex erfolgte über Nacht bei 37°C im begasten Brutschrank (5 % CO₂).

Kulturschale	Zellzahl	DNA	Enhancer	EC-Puffer	Effectene	Medium	Medium
		µg	µl	Endvolumen µl	µl	Komplex µl	Zellen µl
24 Loch-Platte	2,0-8,0 x 10 ⁴	0,2	1,6	60	5	350	350
6 Loch-Platte	0,9-4,0 x 10 ⁵	0,4	3,2	100	10	600	600

Die Methode des Western Blots ermöglicht die Immobilisierung von Proteinen auf einer geeigneten Membran. Dadurch werden verschiedene Färbe-, Nachweis- und Analysemethoden ermöglicht, die im Gel nicht durchführbar sind.

Die Membranen binden die Proteine durch hydrophobe bzw. hydrophobe und ionische Wechselwirkungen. Der Transfer der Proteine erfolgt elektrophoretisch. Neben der Möglichkeit des unspezifischen Nachweises membrangebundener Proteine (Kap. 3.14.3) ist die am häufigsten verwendete Variante des Western Blots der Immunoblot, bei dem Proteine gezielt mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen werden können.

3.14 Immuno-/Western Blot

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung in der SDS-PAGE wurden die Proteine auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Die Membran und zwei Filterpapiere wurden auf Gelgröße zurechtgeschnitten. Die Hydrophobizität der verwendeten Membran machte eine kurze Vorinkubation in Methanol erforderlich. Die mit ddH₂O gespülte Membran, die Filterpapiere und das Gel wurden in Transferpuffer äquilibriert und luftblasenfrei zum Blotsandwich zusammengestellt. Nach Aufbau erfolgte der Transfer mit ~ 3 mA pro cm² Gel für 45 min bei RT.

3.14.1 Immunologische Detektion membrangebundener Proteine

Nach elektrophoretischem Transfer lassen sich die immobilisierten Proteine durch eine Antikörper spezifizierte Enzymreaktion detektieren (48, 122). Der nach primärer Antikörperinkubation ausgebildete Antigen-Antikörper-Komplex wird nach einer nachfolgenden Inkubation mit einem enzymkonjugierten Sekundärantikörper durch enzymatische Umsetzung des Substrats Luminol visualisiert. Bei dem konjugierten Enzym handelte es sich um Meerrettich-Peroxidase, welche die Oxidation von Luminol (ein zyklisches Diazyldiazid) in Gegenwart von Wasserstoffperoxid unter Chemilumineszenzentwicklung katalysiert.

Durch Inkubation in Blockpuffer für 2 h bei RT unter leichtem Schwenken wurden unspezifische Bindungsstellen abgesättigt. Die Membran wurde kurz mit Waschpuffer gespült und nachfolgend für 1 h bei RT in primärer Antikörperlösung inkubiert. Die Membran wurde dreimal für jeweils 10 min mit Waschpuffer gewaschen und mit sekundärer Antikörperlösung inkubiert. Nach 1 h bei RT wurde wiederum dreimal für jeweils 10 min gewaschen, mit einer ausreichenden Menge Detektionslösung (0,125 ml/cm²) überschichtet und für 1 min bei RT inkubiert. Die Visualisierung der Signale erfolgte über Autoradiographie mit einer Expositionszeit von ca. 2 min.

3.14.2 Färbung membrangebundener Proteine

Vor der immunologischen Detektion wurden immobilisierte Proteine auf der PVDF-Membran reversibel gefärbt. Zu diesem Zweck wurde die Membran für ca. 1 min in 5 ml Ponceau S-Färbelösung inkubiert und anschließend mit ddH₂O entfärbt. Nach Abtrennen des Größenmarkers wurde die Membran wie oben beschrieben (Kap. 3.14.2) weiterbehandelt. Der abgetrennte Größenmarker hingegen wurde durch einminütige Inkubation in 5 ml Amidoschwarz-Färbelösung irreversibel angefärbt (157), mit Entfärbelösung entfärbt, an der Luft getrocknet und bis zur weiteren Verwendung im Dunkeln gelagert.

3.15 Detektion fluoreszenzmarkierter DNA

Die Detektion fluoreszenzmarkierter DNA erfolgte über den Fluorescent Image Analyzer. Zwei integrierte Laser emittieren Licht unterschiedlicher Wellenlänge (SHG-Laser: 473 nm, He-Ne-Laser: 633 nm). Das emittierte Licht der angeregten Fluorochrome wird nach Passieren geeigneter Filter detektiert und gespeichert. Die Filter sind, wie das Licht der Laser, spezifisch für jedes einzelne Fluorochrom (SHG: Y520 und O580, He-Ne: R675). Die Detektion Cy5-markierter DNA erfolgte nach Einstellen der spezifischen Wellenlänge und Filter (633 nm, R675), der Leseempfindlichkeit (F1000, wobei F1 = niedrigste Sensitivität und F1000 = F1 Sensitivität × 1000), der Farbabstufung (256 Farben) und der Auflösung (200 µm).

3.16 Hybridisierung von Nukleinsäuren

Zur Hybridisierung wurden jeweils 1 nmol zweier einander komplementärer Oligonukleotide in Tris/HCl (pH 7,5) in einem Gesamtvolumen von 40 µl für 5 min bei 95°C im Kochwasserbad inkubiert, um eine vollständige Denaturierung zu gewährleisten. Die Hybridisierungsansätze wurden anschließend im Wasserbad auf RT abgekühlt. Nach kurzer Zentrifugation wurde der Hybridisierungsgrad anhand eines 1%igen Agarosegels (Kap. 3.3) und anschließender Detektion über den Fluorescent Image Analyzer (Kap. 3.15) überprüft.

Im Falle unvollständiger Hybridisierung wurden die ausgebildeten Hybride von den einzelsträngigen DNA-Fragmenten getrennt (Kap. 3.17).

3.17 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Polyacrylamidgelen

***crush and soak* Methode**

Die *crush and soak* Methode (100) zur Isolierung von einzel- und doppelsträngiger DNA aus nativen und denaturierenden Polyacrylamidgelen wurde mit folgenden Modifikationen durchgeführt:

Nach Auftrennung der DNA-Hybride über Polyacrylamidgelelektrophorese (Kap. 3.11) wurden die Banden der Hybride (Kap. 3.16) nach Detektion über den Fluorescent Image Analyzer (Kap. 3.15) ausgeschnitten. Nach Zerkleinern der Gelstücke und Zugabe des dreifachen Volumens TE-Puffer wurde die DNA durch Inkubation für 3 h bei 37°C und 200 Upm auf dem Schüttler eluiert. Die DNA-haltige Lösung wurde zentrifugiert (13000 Upm, 1 min, RT, Mikroliterrotor, Biofuge), der Überstand abgenommen und das Pellet in 50 µl TE-Puffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wurden die Überstände vereinigt und verbliebene Polyacrylamidreste durch Zentrifugation über Oligotex-Säulen entfernt.

3.18 Yeast Two-Hybrid: MATCHMAKER Two-Hybrid-System 3

Das Two-Hybrid-System stellt eine gängige Methode für die Charakterisierung von Protein-Protein-Interaktionen dar. Es basiert auf der biologischen Wirkung eukaryotischer Transkriptionsfaktoren, welche im Wesentlichen aus zwei Struktur- bzw. Funktionseinheiten bestehen. Über die so genannte DNA-Bindedomäne (BD) wird die sequenzspezifische Interaktion mit der DNA gewährleistet. Die so genannte Aktivierungsdomäne (AD) vermittelt nachfolgend die Transkription über Kontakt mit dem basalen Transkriptionsapparat. Die Spezifität der Aktivierung wird dabei einzig durch die DNA-Bindedomäne und somit über die Interaktion mit speziellen Promotorsequenzen garantiert. Eine physische Entkopplung der Aktivierungsdomäne von der DNA-Bindedomäne führt zum Funktionsverlust, wobei eine Rekonstituierung der Funktion durch räumliche Nähe beider Funktionseinheiten gewährleistet

wird. Das MATCHMAKER Two-Hybrid-System 3 macht sich die Funktionseinheiten des Transkriptionsfaktors Gal4 (Gal4-BD und Gal4-AD) aus *Saccharomyces cerevisiae* zunutze. Über die Interaktion dieses Transkriptionsfaktors mit drei heterologen UAS (upstream activating sequences) und Promotorelementen innerhalb des Genoms des Hefestammes AH109 wird die nachfolgende Transkription der Reportergene *his3*, *ade2* und *mel1/lacZ* reguliert. Durch die Konstruktion geeigneter Plasmide, welche die Expression eines Gal4-BD-Fusionsproteins einerseits und die Expression eines Gal4-AD-Fusionsproteins andererseits nach Transfektion in geeigneten Hefezellen (AH109) erlauben, lassen sich unterschiedliche Protein-Protein-Interaktionen identifizieren. Durch eine Interaktion der Fusionsproteine wird die für die Funktion des Transkriptionsfaktors notwendige Kopplung der Funktionseinheiten gewährleistet. Die Wirkung des auf diese Weise rekonstituierten Transkriptionsfaktors ist also direkt abhängig von der Interaktion der Fusionsproteine und lässt sich über Expression der entsprechenden Reportergene verifizieren.

3.18.1 Transformation kompetenter Hefezellen

Die Transformation kompetenter Hefezellen erfolgte nach den Angaben des Herstellers, wobei sich die Protokolle hinsichtlich des Maßstabs der Transformation unterschieden. Die DNA-BD und AD Fusionsvektoren (pGBKT7 und pGADT7) des MATCHMAKER Two-Hybrid-System 3 gewährleisten die Expression heterologer Proteine als Gal4-Fusionen mit c-Myc- (pGBKT7) und HA- (pGADT7) Epitop. Beide Vektoren tragen darüber hinaus einen pUC Replikationsorigin, kodieren unterschiedliche bakterielle Selektionsmarker (pGBKT7 Kanamycin, pGADT7 Ampicillin) und bieten die Möglichkeit der *in vitro* Transkription/Translation über einen T7-Promotor *downstream* der Gal4-kodierenden Sequenzen.

Nach Mischen der rekombinanten Plasmide (DNA-BD/DNA-AD = 2/1) mit *carrier* DNA und der entsprechenden Menge kompetenter Zellen durch kurzes Vortexen erfolgte die Zugabe steriler PEG/LiAc-Lösung und erneutes Mischen durch Vortexen. Einer Inkubation für 30 min bei 200 UpM und 30°C auf dem Schüttler und vorsichtigem Mischen mit DMSO schloss sich ein Hitzeschock für 15 min bei 42°C im Wasserbad an. Die Transformationsansätze wurden nachfolgend für 2 min auf Eis inkubiert und bei RT zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands und Resuspendieren der Zellen in sterilem TE-Puffer wurde eine geeignete Menge jedes Transformationsansatzes auf Selektionsmedium ausplattiert und 7 Tage bei 30°C im Brutraum inkubiert.

	Transformationsmaßstab		
	klein	mittel	Bibliothek
DNA-BD	0,2 µg	20-100 µg	0,2-1,0 mg
DNA-AD	0,1 µg	10-50 µg	0,1-0,5 mg
carrier DNA	0,1 mg	2 mg	20 mg
kompetente Hefezellen	0,1 ml	1 ml	8 ml
PEG/LiAc-Lösung	0,6 ml	6 ml	60 ml
DMSO	70 µl	700 µl	7,0 ml
Zentrifugation	5 sec	5 min	5 min
TE-Puffer	0,5 ml	1,0 ml	10 ml

3.18.2 Herstellung kompetenter Hefezellen

Für die Herstellung kompetenter Zellen wurde der Hefestamm AH109 verwendet, welcher durch die Expression dreier Reportergene (*ade2*, *his3*, *mel1/lacZ*) unter Kontrolle heterologer Gal4-sensitiver UAS und Promotorelemente (GAL1, GAL2, MEL1) die Eliminierung falsch positiver Interaktionen gewährleistet.

GAL1 UAS	GAL1 TATA	<i>his3</i>
GAL2 UAS	GAL2 TATA	<i>ade2</i>
MEL1 UAS	MEL1 TATA	<i>lacZ</i>

Während Transkription der Reportergene *ade2* bzw. *his3* und Expression der entsprechenden Proteine (69) das Wachstum auf Adenin bzw. Histidin defizientem Selektionsmedium erlaubt, wird über α - bzw. β -Galaktosidaseexpression (*mel* bzw. *lacZ*) eine Blau-Weiß-Selektion ermöglicht.

Für die Präparation kompetenter Hefezellen wurde eine frisch gewachsene vereinzelte Transformante (2-3 mm) in 1 ml YPDA-Medium durch Vortexen vollständig resuspendiert. Je nach Transformationsmaßstab wurde eine entsprechende Menge YPDA-Medium im Erlenmeyerkolben mit diesem Inokulum (1 ml) beimpft und bis Erreichen einer $OD_{600} > 1,5$ bei 30°C und 250 UpM auf dem Schüttler inkubiert (16-18 h). Frisches YPDA-Medium wurde mit der Übernachtskultur beimpft ($OD_{600} = 0,2-0,3$) und für 3 h bei 30°C und 250 UpM auf dem Schüttler inkubiert ($OD_{600} = 0,5 \pm 0,1$). Nach Zentrifugation (2000 Upm, 7 min, RT,

GSA-Rotor, Sorvall) wurden die Pellets in sterilem TE-Puffer resuspendiert, ggf. vereinigt und erneut zentrifugiert (2000 UpM, 7 min, RT, GSA-Rotor, Sorvall). Nach Resuspendieren der Zellpellets in sterilem TE/LiAc wurden die kompetenten Hefezellen bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

	Transformationsmaßstab					
	klein		mittel		Bibliothek	
YPDA Übernachtskultur	50	ml	50	ml	150	ml
YPDA 3 h-Kultur	300	ml	300	ml	1	l
TE-Puffer	50	ml	50	ml	500	ml
TE/LiAc	1,5	ml	1,5	ml	8	ml

3.19 Immunopräzipitation

Der Begriff Immunopräzipitation beschreibt die Ausfällung löslichen Antigens mit Hilfe von spezifischen Antikörpern als Antigen-Antikörper-Komplex. Der Verlust der Löslichkeit der Antigen-Antikörper-Komplexe wird durch Zugabe unlöslicher Partikel erreicht, die wiederum spezifisch die verwendeten Antikörper komplexieren.

In der Immunopräzipitation lassen sich über Kopräzipitation von Interaktionspartnern spezifische Protein-Protein-Interaktionen detektieren.

Um die homologe und heterologe Interaktion der PCV1-Replikationsproteine über die Koimmunopräzipitation zu identifizieren, wurden Rep und Rep' als His- bzw. FLAG-Fusionsproteine bakteriell exprimiert.

Die Expression der Replikationsproteine Rep und Rep' von PCV1 als N-terminale His- und FLAG-Fusionsproteine (Anhang A.7) erfolgte in RosettaBlue(DE3)pLacI-Zellen (Kap. 3.20).

Die Zellpellets wurden auf Eis aufgetaut und in jeweils 3 ml vorgekühltem PBS (4°C) mit 120 µl Protease Inhibitor (25x) vorsichtig resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte über Ultraschall in drei Intervallen für jeweils 5 sec mit 400 W. Um eine Hitzedenaturierung der Proteine zu verhindern, wurden die Proben zwischen den einzelnen Intervallen auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von Benzonase (25 U) und r-Lysozym (3 KU) und einer Inkubation für 15 min bei RT unter stetem Schwenken wurde die lösliche Fraktion durch Zentrifugation

(13000 UpM, 5 min, RT, TTH-750-Rotor, Multifuge) von unlöslichen Bestandteilen getrennt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Für die Detektion einer potentiellen homologen bzw. heterologen Interaktion der Replikationsproteine Rep und Rep' von PCV1 wurden jeweils 1,5 ml lösliche Fraktion des His-Fusionsproteins und des FLAG-Fusionsproteins vereinigt und über Nacht bei 4°C unter Schwenken inkubiert.

Nach Zugabe von jeweils 10 µg anti-FLAG Antikörper wurden die Proben für eine weitere Stunde bei 4°C unter stetem Schwenken inkubiert.

Die Präzipitation der löslichen Antigen-Komplexe (s.o.) erfolgte durch Zugabe von 40 µl einer 1:1 Suspension aus PBS und Protein G-Sepharose und Inkubation bei 4°C für 1 h unter Schwenken. Durch Zentrifugation (10000 UpM, 10 sec, 4°C, Mikroliterrotor, Biofuge) wurden die Komplexe aus Protein G-Sepharose, anti-FLAG Antikörper und Antigen präzipitiert.

Um unspezifische Protein-Protein-Interaktionen zu entfernen, wurden die Protein G-Sepharose-Pellets nachfolgend in jeweils 1 ml eisgekühltem PBS mit 0,1 % NP40 resuspendiert und 5 min unter Schwenken bei 4°C inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets zwei weitere Male unter gleichen Bedingungen gewaschen. Es folgte die Zugabe von jeweils 50 µl SDS-PAGE Probenpuffer und eine fünfminütige Inkubation bei 95°C im Kochwasserbad. Nach Zentrifugation (10000 UpM, 5 min, RT, Mikroliterrotor, Biofuge) wurde der Überstand abgenommen und auf Eis gelagert. Zum Nachweis einer Koimmunopräzipitation und damit einer Protein-Protein-Interaktion wurden die Proben nach SDS-PAGE (Kap. 3.11) im Immunoblot (Kap. 3.14.1) analysiert.

3.20 Proteinexpression in *E. coli*

Nach Klonierung der entsprechenden Expressionsvektoren (Anhang A.7) wurden die viralen Replikationsproteine in RosettaBlue(DE3)pLacI-Zellen als N-terminale FLAG- bzw. His-Fusionsproteine oder in BL21-Zellen als N-terminale GST-Fusionsproteine zur Expression gebracht. Die Expressionsvektoren stellen dabei das initiale Kodon (ATG) der Translation zur Verfügung. Der verwendete Expressionsstamm garantiert hohe Transformationseffizienz und gewährleistet die Expression des Zielproteins nach Induktion mit IPTG. Durch Expression des *lac*-Repressors (158) wird die stringente Repression im nicht-induzierten Zustand sichergestellt. Die durch die *codon usage* von *E. coli* limitierte Expression eukaryotischer

Proteine gleich RosettaBlue(DE3)pLacI durch Expression seltener tRNAs aus, die zusammen mit dem *lac*-Repressor und einem Selektionsmarker (Chloramphenicol) auf dem Plasmid pLacI kodiert sind.

Nach Auftauen der Zellen (jeweils 20 μ l) auf Eis, Zugabe des entsprechenden Expressionsvektors (1 μ l, 100 ng/ μ l) und vorsichtigem Mischen erfolgte eine fünfminütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurden die Transformationsansätze für exakt 30 sec bei 42°C im Wasserbad einem Hitzeschock unterzogen und nachfolgend erneut für 5 min auf Eis inkubiert. Nach Mischen mit 80 μ l vorgewärmtem (RT) SOC-Medium wurden jeweils 15 μ l eines Transformationsansatzes auf vorgewärmten Agarplatten mit Ampicillin (50 μ g/ml), Chloramphenicol (30 μ g/ml) und Glucose (1 %) ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Als Übernachtskulturen für die Expression wurden 10 ml LB-Medium mit Ampicillin (50 μ g/ml), Chloramphenicol (30 μ g/ml) und Glucose (1 %) in 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikane mit einer vereinzelt Transformante (s.o.) beimpft und über Nacht bei 33°C und 200 UpM auf dem Schüttler inkubiert.

Die Expression erfolgte in 500 ml Erlenmeyerkolben mit Schikane bei 33°C und 200 UpM auf dem Schüttler. 50 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika (Ampicillin 50 μ g/ml, Chloramphenicol 30 μ g/ml) und Glucose (1 %) wurden mit einem entsprechenden Inokkulum der Übernachtskultur beimpft (OD_{588nm} 0,15) und auf dem Schüttler inkubiert. Nach Erreichen der mid-log Phase (OD_{588nm} 0.6-0.8) erfolgte die Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von 50 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 μ g/ml) und IPTG (0,5 mM). Nach 2 h wurde die Expression durch zehnmütige Inkubation auf Eis gestoppt. Die Zellen wurden durch niedertourige Zentrifugation (8000 Upm, 10 min, 4°C, TTH-750, Multifuge) in vorgekühlten Greinerröhrchen pelletiert. Die Überstände wurden dekantiert, die Pellets in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

3.21 Aufreinigung der bakteriell exprimierten Fusionsproteine

3.21.1 Aufschluss der Zellen und Präparation der löslichen Fraktion

Die Zellpellets wurden auf Eis aufgetaut, in BugBuster Protein Extraction Reagent (5 ml BugBuster/1 g Zellpellet) vorsichtig resuspendiert und mit Benzonase (25 U), r-Lysozym (3 KU) und Protease Inhibitor (25x) versetzt. Nach Inkubation für 15 min bei RT unter stetem Schwenken wurde die lösliche Fraktion durch Zentrifugation (13000 Upm, 5 min, RT, TTH-750-Rotor, Multifuge) von unlöslichen Bestandteilen getrennt.

3.21.2 Aufreinigung der His- und GST-Fusionsproteine

Die Aufreinigung der His-Fusionsproteine erfolgte über die so genannte Immobilisierte Metall Affinitätschromatography (IMAC, (125)). Dabei bilden freie Elektronenpaare unterschiedlicher Aminosäureseitenketten mit zweifach positiv geladenen Metallionen eine koordinative Bindung aus. So kommt es beispielsweise zwischen Nickel und dem Imidazolring der Histidin-Seitengruppen zur Ausbildung eines metallorganischen Komplexes. Die Aufreinigung der His-Fusionsproteine erfolgte unter geeigneten Pufferbedingungen nach den Angaben des Herstellers mit Ni-NTA-Agarose.

Die lösliche Fraktion (s.o.) wurde mit H₂O verdünnt (1:4), mit Bindepuffer (2x) versetzt (1:2) und gemischt. Es folgte die Zugabe von jeweils 150 µl Ni-NTA-Agarose und eine Inkubation für 30 min bei RT unter stetem Schwenken. Vor Applikation wurde eine entsprechende Menge Ni-NTA-Agarose mit H₂O gewaschen und in einem Äquivalentvolumen Bindepuffer (1x) resuspendiert. Nach Zentrifugation (2000 Upm, 2 min, RT, TTH-750-Rotor, Multifuge) wurden die Überstände vorsichtig dekantiert, die Pellets in 20 ml Waschpuffer (1x, 20 mM Imidazol) resuspendiert und für 15 min bei RT unter stetem Schwenken inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift (1x, 20 mM Imidazol) mit 5 ml Waschpuffer auf Poly-Prep Chromatographiesäulen. Nachfolgend wurden die His-Fusionsproteine durch zweimalige Zugabe von jeweils 0,3 ml Elutionspuffer (1x, 250 mM Imidazol) eluiert und die Eluate auf Eis inkubiert.

Die Aufreinigung der GST-Fusionsproteine erfolgte ebenfalls über Affinitätschromatographie unter Verwendung von Glutathion-Sepharose. Nach Verdünnen mit H₂O (1:4) wurde die

lösliche Fraktion mit PBS (10x) versetzt (1:10) und gemischt. Es folgte die Zugabe von 100 µl Glutathion-Sepharose und Inkubation für 30 min. Vor Applikation wurde eine entsprechende Menge Glutathion-Sepharose mit PBS (1x) gewaschen und in einem Äquivalentvolumen PBS (1x) resuspendiert. Die Pellets wurden in 20 ml PBS (1x) resuspendiert und 15 min bei RT inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschriff mit 5 ml PBS (1x) auf Poly-Prep Chromatographiesäulen bevor die Proteine durch zweimalige Zugabe von 0,3 ml Elutionspuffer eluiert wurden. Die Eluate wurden auf Eis bei 4°C gelagert.

3.21.3 Umpuffern der aufgereinigten Proteinlösungen

Das Umpuffern der Proteinlösungen erfolgte in Filtrerröhrchen mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDA (Microcon YM-10). Nach Zentrifugation (10000 Upm, 5 min, 15°C, Mikroliterrotor, Biofuge) wurden die Röhrchen mit TE-Puffer aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde insgesamt dreimal wiederholt. Die Elution der Proteine erfolgte durch Umdrehen der Filtrerröhrchen und Zentrifugation (2000 Upm, 2 min, 15°C, Mikroliterrotor, Biofuge) in eine neue Vorlage.

3.22 Restriktionsassay und Restriktions-/Ligationsassay

Um eine Restriktions- oder Ligationsaktivität der PCV-Replikationsproteine Rep und Rep' bzw. die Restriktionsaktivität des Protein-DNA-Komplexes nach erster Restriktion gegenüber dem viralen Replikationsorigin *in vitro* zu untersuchen, wurden Rep oder Rep' als aufgereinigte His-Fusionsproteine bzw. der präzipitierte Protein-DNA-Komplex mit Oligonukleotiden, welche einem Teilfragment des Replikationsorigins von PCV in Plusstrangorientierung entsprachen (Anhang A.6), inkubiert.

Für die Restriktionsreaktion wurden 0,5 pmol des markierten DNA-Substrats mit 500 ng aufgereinigtem Fusionsprotein oder der Negativkontrolle in einem Gesamtvolumen von 30 µl in Restriktionspuffer (1x) für 90 min bei 37°C inkubiert. Nachfolgend wurden die Reaktionsprodukte über PAGE in einem 5,5%igen Gel analysiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte entweder in nicht denaturierenden Gelen bei RT oder aber unter denaturierenden Bedingungen (6,7 M Harnstoff) bei 65°C. Optional wurden die Reaktionsansätze vor der PAGE einem proteolytischen Verdau mit Proteinase K unterzogen,

um mögliche Protein-DNA-Komplexe aufzulösen. Nach Zugabe von 1 μ l Proteinase K wurden die Reaktionsansätze für weitere 15 min bei 37°C inkubiert.

In der Restriktions-/Ligationsreaktion wurden jeweils 0,5 pmol markiertes und unmarkiertes DNA-Substrat mit 500 ng aufgereinigtem Fusionsprotein unter gleichen Bedingungen inkubiert. Die Auftrennung der Reaktionsprodukte erfolgte in der PAGE über ein 5,5%iges Gel bei 65°C.

Um die Fähigkeit der kovalent mit der DNA verknüpften Replikationsproteine zur Einführung eines weiteren Einzelstrangbruchs innerhalb des viralen Replikationsorigins zu untersuchen, wurden die Protein-DNA-Komplexe nach Reaktion von Rep oder Rep' mit dem Oligonukleotid F1165 (Kap. 3.24) präzipitiert. Zu diesem Zweck wurden 40 μ l der vorangegangenen Reaktion (Kap. 3.24) mit 40 μ l anti-Biotin Agarose und 120 μ l TE-Puffer versetzt und 30 min bei RT inkubiert. Vor Applikation wurde eine entsprechende Menge anti-Biotin Agarose in TE-Puffer äquilibriert. Nach Zentrifugation (13000 Upm, 10 sec, 4°C, Mikroliterrotor, Biofuge) und Verwerfen des Überstands wurden die Pellets mit 500 μ l TE-Puffer versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Die präzipitierten und gewaschenen Protein-DNA-Komplexe wurden mit 0,5 pmol Oligonukleotid F617 in einem Gesamtvolumen von 30 μ l in Restriktionspuffer für 90 min bei 37°C inkubiert. Nachfolgend wurden die Reaktionsprodukte in der PAGE über ein 5,5%iges Gel aufgetrennt.

Die Visualisierung der Reaktionsprodukte erfolgte anschließend über den FLA-2000 (Kap. 3.15).

3.23 Kovalente Verknüpfung von Rep und Rep' mit dem 5'-Ende des 3'-Schnittprodukts

Um die kovalente Verknüpfung von Rep und Rep' mit der DNA nach Restriktion zu untersuchen, wurde das Substrat F1165 in einem vierstufigen Konzentrationsbereich von 0,5 bis 100 pmol mit 1 μ g aufgereinigtem Fusionsprotein in Restriktionspuffer in einem Gesamtvolumen von 50 μ l für 90 min bei 37°C inkubiert. 10 μ l des Reaktionsansatzes wurden nachfolgend mit 10 μ l SDS-Probenpuffer (2x) versetzt und für 5 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsprodukte in der SDS-PAGE über ein 10%iges Gel

aufgetrennt. Der Immobilisierung auf einer PVDF-Membran folgte die Detektion mit dem anti-Biotin oder anti-His-Epitop Antikörper.

3.24 Zellkultur

Hinsichtlich der Transfektionen wurden PK15-Zellen verwendet, die der Zellkultursammlung der Arbeitsgruppe entnommen wurden. Ein entsprechendes Aliquot wurde bei 37°C im Wasserbad aufgetaut mit Kulturmedium versetzt. Das Zellpellet wurde nach Zentrifugation (1200 UpM, 5 min, RT, TTH-750, Multifuge) in Kulturmedium resuspendiert und in einer 25 cm² Zellkulturflasche bis zur Ausbildung eines konfluent gewachsenen Zellrasens bei 37°C im begasten Feuchtbrutschrank inkubiert. Für die weitere Kultivierung der adhären Zellen wurden Zellkulturflaschen unterschiedlicher Größe verwendet. Das Ablösen der Zellen erfolgte nach vollständigem Entfernen des Kulturmediums und Waschen mit PBS durch Zugabe eines geeigneten Volumens Trypsinlösung und nachfolgender Inkubation für ca. 5 min bei 37°C im begasten Feuchtbrutschrank. Anschließend wurden die Zellen in Kulturmedium vollständig resuspendiert, in einer Verdünnung von 1:10 in neue Zellkulturflaschen überführt und bis zur Ausbildung eines konfluenten Zellrasens bei 37°C im begasten Feuchtbrutschrank inkubiert.

	Zellkulturflaschen					
	175 cm ²		80 cm ²		25 cm ²	
Kulturmedium	30	ml	80	ml	7	ml
Trypsinlösung	3	ml	2	ml	1	ml

Einen Tag vor Transfektion wurden die Zellen in einer geeigneten Verdünnung in Kulturmedium ausgesät und über Nacht bei 37°C im begasten Feuchtbrutschrank inkubiert.

	Zellkulturflasche	Zellkulturschale	Zellkulturplatte	
	175 cm ²	60 mm	6-Loch	24-Loch
Kulturmedium	80 ml	5 ml	3 ml	1 ml

3.25 ATPase-Assay

Um die Fähigkeit des Rep-Proteins von PCV1 hinsichtlich der ATP-Hydrolyse zu untersuchen, wurden 500 ng des aufgereinigten His-Fusionsproteins *in vitro* in Gegenwart von 2 μ Ci [γ -³²P]ATP unter geeigneten Pufferbedingungen (1x ATPase-Puffer) in einem Gesamtvolumen von 32 μ l für 45 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 200 μ l 7,5 % aktivierter Aktivkohle in 50 mM HCl/5 mM H₃PO₄ wurde nachfolgend nicht umgesetztes ATP gebunden und nach Inkubation für 5 min bei RT präzipitiert (13000 Upm, 10 min, RT, Mikroliterrotor, Biofuge). Die im Überstand befindliche Menge an freiem radioaktivem Phosphat (P_i) wurde im Szintillationszähler bestimmt.

(69)