

3. Material und Methoden

3.1. Material

Chemikalien, Enzyme und Immunreagenzien

- **Chemikalien, Enzyme**

Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
BioBead SM2	BioRad, München
BioRad Proteinassay DC	BioRad, München
Bisbenzimid Hoechst 33258	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chloroform	Merck, Darmstadt
Cholesterol (Chol)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Coomassie Brillant Blau	Serva, Heidelberg
DNase I	Roche, Mannheim
Phosphatidylcholin (Ei-PC)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phosphatidylethanolamin (Ei-PE)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glucose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glutardialdehyd	Roth, Karlsruhe
Glycerol	Ferak, Berlin
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hank`s Salzlösung (HSS)	Gibco BRL, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Lipofektin	Gibco BRL, Berlin
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich, Steinheim

Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natrium-Laktat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natrium Pyruvat	Biochrom, Berlin
Natriumthiosulfat (Na ₂ S ₂ O ₃)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
N-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole-dipalmitoyl -phosphatidylethanolamine (NBD-PE)	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Neuraminidase (NA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Octadecylrhodamin-B-chlorid (R18)	Molecular Probes, Eugene, USA
Oligonukleotid-Primer	Invitek, Berlin
PeqGold Marker	peqLab, Erlangen
Poly-L-lysine (MW: 22,1 kDa)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Steinheim
N-(Lissamin tm rhodamine B sulfonyl)-1,2-dioleoyl -sn-glycero-3-phosphoethanolamine (Rh-PE)	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
RNase	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Rotiphenol	Roth, Karlsruhe
Silbernitrat	Roth, Karlsruhe
Sphingomyelin (Sphm)	Sigma-Aldrich, Steinheim
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	BioRad, München
Tris	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Roche, Mannheim
UHU	Uhu, Bühl
YT-Medium	Gibco BRL, Berlin
Zitronensäure	Sigma-Aldrich, Steinheim

Viren und Zellkultur

- **Viren**

Influenzavirus: Stamm X-31 (Prof. A. Herrmann, Institut für Biologie, Humboldt Universität Berlin)

Sendaivirus: Stamm Z (erhalten vom Institut für Virologie, Justus-Liebig-Universität Gießen)

- **Zellderivate, Zelluläre Replikationssysteme**

Spezifisch Pathogenfreie (SPF)-Hühnereier: Lohmann Tierzucht, Cuxhaven

Erythrozyten: Blutgruppe 0, Rhesus positiv, Deutsches Rotes Kreuz

kryokonservierte Bullenspermien: erhalten vom Institut für Fortpflanzung der Nutztiere Schönow e.V., Schönow

flüssigkonservierte Eberspermien: erhalten vom Institut für Fortpflanzung der Nutztiere Schönow e.V., Schönow

- **Plasmid**

pCX-EGFP: Plasmid, das für das „enhanced green fluorescence“ Protein (EGFP) kodiert, eine freundliche Gabe von E. Ponimaskin, Institut für Immunologie und Molekularbiologie des FB Veterinärmedizin der FU Berlin (**Abbildung 3**).

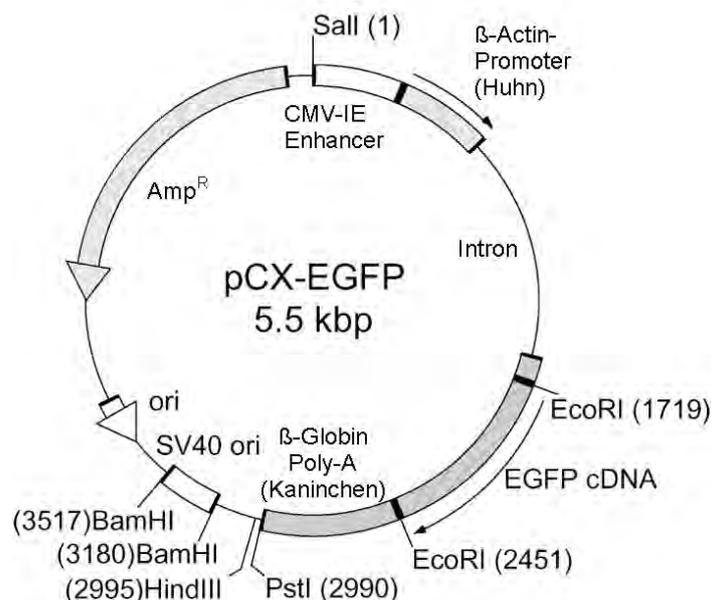


Abbildung 3: Plasmid-Mappe von pCX-EGFP, die EGFP-cDNA steht unter Kontrolle eines β -Actin Promoters vom Huhn. (Ikawa *et al.*, 1995)

Spezielle Geräte und Testbestecke

- **Zentrifugen**

Beckman TL-100 Ultrazentrifuge, Rotor: TLA 100.2

Beckman L7 Ultrazentrifuge, 45 Ti

Heraeus Biofuge 28 RS, Rotor 3751, Eppendorfroter 3740

- **Mikroskope**

Fluoreszenzmikroskop: Zeiss Axioskope

Zeiss Axiovert

- **Dokumentation**

Metamorph, Adobe Photoshop

- **Geräte und Kits zur quantitativen und qualitativen Proteinbestimmung**

ELISA-Reader: Tecan Spectra Classic, Austria

3.2. Methoden

3.2.1. Virusanzucht, -reinigung und -charakterisierung

- **Virusanzucht**

Die Anzucht der Viren erfolgt im embryonierten Hühnerei. Hierzu werden SPF-Bruteier (Lohmann, Cuxhaven) elf Tage im Brutschrank bei 38°C und 40% Luftfeuchtigkeit (Wendung alle 4 Stunden) bebrütet. Unter Durchleuchtung werden mit einem Bleistift auf der Schale Luftkammer und eine gefäßfreie Stelle an der Chorion-Allantois-Membran (CAM) angezeichnet. Die Desinfektion der Eischalen erfolgt unter sterilen Bedingungen mit Iodlösung DAB (Deutsches Arzneimittelbuch) 6. Anschließend wird die Eischale mit einer sterilen Präpariernadel im Bereich der Luftkammer und an der vorher markierten Stelle perforiert. Unter Verwendung einer 1ml Spritze und einer 18er Kanüle (Braun, Melsungen) werden 200 µl einer mit Phosphat Buffered Saline (PBS, Zusammensetzung s. Anhang) im

3. Material und Methoden

Verhältnis 5000:1 verdünnten Allantoisflüssigkeit in die Allantoishöhle injiziert. Die Löcher in der Eischale werden mit UHU-Alleskleber (UHU, Bühl) verschlossen.

Nach 2 Tagen im Brutschrank werden die Embryonen durch Lagerung über Nacht bei 4°C abgetötet. Die Eischale wird im Bereich der Luftkammer unter sterilen Bedingungen mit Schere und Pinzette abgetrennt. CAM und Embryo werden beiseitegeschoben und die Allantoisflüssigkeit abgenommen und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

- **Virusreinigung durch Differentialzentrifugation**

Die Virusreinigung erfolgt mittels fraktionierter Zentrifugation. Dabei werden die zellulären Bestandteile in der Allantoisflüssigkeit zunächst durch niedertourige Zentrifugation abgetrennt (1500 x g, 4° C, 30 min, Zentrifuge: MLW K26D). Der Überstand wird abgenommen und zur Aufreinigung des Virus 25.000 x g, 4° C, 150 min (Avanti J25, JLA-16.250, Beckman-Coulter) zentrifugiert. Das Pellet wird in 0,5 ml steriler PBS gelöst und über Nacht bei 4° C inkubiert. Mit Hilfe des DC Protein Assays von BioRad, München erfolgt die Bestimmung des Proteingehaltes nach Angaben des Herstellers (s. auch nächster Punkt). Der Proteingehalt der Virussuspension wird mit PBS auf 5 mg/ml virales Protein eingestellt und bis zur Verwendung in Kryoröhrchen (Roth, Karlsruhe) bei -80°C gelagert.

Aus 150 Eiern können etwa 20 mg Virusprotein gewonnen werden.

- **Proteinbestimmung**

Die quantitative Proteinbestimmung erfolgt mittels eines modifizierten Lowry-Assays der Firma BioRad (BioRad DC Protein Assay, München). Als Referenzprotein dient BSA.

Jeweils 5 µl Eichlösung bzw. Virus-/Virosomensuspension werden in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte mit V-Boden (Greiner, Kremsmünster, Österreich) gegeben und der Test nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die Extinktion der Proben wird bei 750 nm in einem Tecan Spectra Classic ELISA-Reader gemessen. Die Werte werden mithilfe des „easywinfitting 6.0a“-Programmes berechnet.

- **Hämolysetest**

Für diesen Test wird Octadecylrhodmain-B-chlorid (R18) in die Virusmembran in hinreichend hoher Konzentration eingebaut, bei der die Fluorophore gegenseitig die Fluoreszenz löschen (Selfquenching). Fusionieren nun die Viren mit den wesentlich größeren Erythrozytenghosts, sinkt die Konzentration des R18 in der gemeinsamen Membran, und die Fluoreszenzintensität steigt infolge von Fluoreszenz-Dequenching.

Der Proteingehalt der Virussuspension wird mit PBS auf 1 mg/ml eingestellt. 500 µl der Virussuspension werden mit 2 µl R18 (2 mM in Ethanol) versetzt und 30 min bei RT inkubiert. Das überschüssige R18 wird nach der Zentrifugation entfernt (41.000 x g, 5 min, 4° C; Heraeus 28 RS, Eppendorfroter #3740). Das Pellet wird in 500 µl Puffer (150 mM NaCl, 10 mM Na-Acetat, pH 7,4) resuspendiert.

100 µl markierte Viren werden mit 200 µl Erythrozytenghosts (hergestellt nach *Dodge et al., 1963*) gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. 30 µl der Lösung werden mit 1970 µl und 37° C warmer PBS in einer Fluoreszenzküvette verdünnt. Die Fluoreszenz wird unter kontinuierlicher Durchmischung im Spektrophotometer über 60 sec gemessen (Exzitation: 560 nm, Emission: 590 nm; AMINCO Bowman II oder SHIMADZU RF5001 PC Fluoreszenz-Spektrometer).

Durch Zugabe von 18 µl Zitronensäure (0.25 M) wird der pH auf 5.0 gesenkt und die Fluoreszenz weiterhin verfolgt. Nach Erreichen des Plateaus werden 50 µl Triton X-100 20% (Endkonzentration 0,5%) zugegeben, wodurch Zugang zu allen Membranen erreicht wird und es zu einer Verdünnung der Fluorophore kommt. Die maximale Fluoreszenzintensität ist erreicht.

Das Ausmaß des Fluoreszenzdequenchings (FDQ) wird nach *Blumenthal et al. (1987)* berechnet.

$$\text{FDQ [\%]} = \frac{100 \times (F_t - F_0)}{(F_\infty - F_0)}$$

Wobei F_0 die Fluoreszenzintensität der Lösung vor Zugabe des Virus, F_t die Fluoreszenzintensität der Lösung zum Zeitpunkt t, d. h. nach Erreichen der höchsten Intensität ohne Zugabe von Triton und F_∞ die maximale Fluoreszenzintensität, d. h. die Fluoreszenzintensität nach Zugabe von Triton, darstellen.

Dieses Experiment wird mit variierenden pH-Werten wiederholt, um das pH-Optimum für die Fusion des Virus mit den humanen Erythrozytenghosts zu ermitteln.

Die so ermittelte Steigerung der Fluoreszenz in Prozent (% FDQ) sind ein Maß für die Fusionsaktivität des verwendeten Virus.

3.2.2. Herstellung der Virosomen

- **Solubilisierung der viralen Glykoproteine und Membranen**

Die Virushülle wird durch das Detergens Triton X-100 aufgelöst. Die in der Hülle enthaltenen Virusproteine und -lipide werden vom Viruscore mit dem viralen Genom durch Zentrifugation abgetrennt.

Zur Virussuspension (5 mg/ml Virusprotein) werden 10% ihres Volumens an Triton X-100 (final 1%) zugegeben, die Mischung für eine Stunde bei 4° C geschüttelt und, zur Abtrennung des Cores, bei 100.000 x g, 4° C, für 60 min zentrifugiert (Beckman TL-100; Rotor: TLA 100.2).

Der Überstand wird abgenommen und für die Herstellung der Virosomen verwendet.

- **Herstellung des exogenen Lipidgemisches**

Die exogenen Lipide (Chol, Sphm, Ei-PC, Ei-PE, NBD-PE, Rh-PE) werden abgewogen und in Chloroform gelöst. Die genaue Zusammensetzung wird bei den Ergebnissen gesondert aufgeführt. Anschließend wird das Lösungsmittel entfernt und der verbleibende Lipidfilm bis zu seiner Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Für die Präparation der Virosomen werden jeweils 5 µl Ethanol (100%, unvergällt), Triton X-100 (10%, 1% im Endvolumen) und 500 µl PBS zugegeben. Nach der vollständigen Auflösung des Lipidfilms wird die Lösung bei 4°C gelagert.

- **Plasmidpräparation**

Plasmidamplifikation (Maxi-Präp)

100 µl des mit dem pCX-EGFP transfizierten Erregerstocks (*E. coli*, Quelle: E. Ponimaskin, Institut für Immunologie und Molekularbiologie, FB Veterinärmedizin, FU Berlin) sind in einem Erlenmeyerkolben mit 200 ml YT-Medium (Gibco, Berlin) und 400 µl Ampicillin unter Schütteln (180 rpm) über Nacht bei 37°C zu inkubieren. Aus der Kultur wird am nächsten Tag unter Verwendung des Quiagen-Plasmid Maxikit (Quiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers die Plasmid-DNS isoliert.

Hierbei werden die Bakterienzellen im alkalischen Milieu durch SDS lysiert. Das Lysat wird über eine Anionenaustauschersäule des Kits gegeben, die das Plasmid bindet. Durch mehrmalige Waschschrte wird das pCX-EGFP eluiert.

Kovalente Fluoreszenz-Markierung der Plasmid-DNA

Zur Lokalisation der Plasmid-DNA im Spermium erfolgt eine Markierung des EGFP-Plasmids mit Hilfe des Label IT Nucleic Acid Labeling Kit (Mirus, Madison). Bei Verwendung dieses Kits können verschiedene Fluorophore an alle Arten DNA und RNA gebunden werden. Die Bindung erfolgt nach Angaben des Herstellers kovalent an Guaninresten, wobei die Stelle dieser Modifikation nicht an der Basenpaarung beteiligt ist. Die Reaktion wird nicht enzymatisch katalysiert. Als Fluorophor wird Fluorescein verwendet (Exzitation: 492 nm, Emission: 518 nm).

Nach Angaben des Herstellers wird die Markierungslösung in 25 µl Rekonstitutionslösung gelöst und gut gemischt. Es werden 2 µl pCX-EGFP (~4,8 µg Plasmid) mit 38 µl DNase/RNase-freiem Wasser, 5 µl Markierungspuffer A (10x), und 5 µl Markierungslösung gemischt.

Die mitgelieferten Säulen sind beidseitig zu öffnen und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 1 min bei 740 x g zu zentrifugieren. Das Reaktionsgefäß ist dann durch ein neues zu ersetzen und das Probenvolumen langsam aufzutragen. Nach einer Zentrifugation für 2 min bei 740 g kann das Reaktionsgefäß mit der Probe bei -20°C eingefroren werden.

Komplexierung der Plasmid-DNA mit Poly-L-Lysin

Die Plasmid-Konzentration in der Lösung wird mithilfe des Eppendorf BioPhotometers bestimmt. Nachdem der DNA-Gehalt auf 800 µg/ml mit PBS eingestellt wurde, wird diese bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

Für die Virosomenpräparation werden 75 µl der Plasmidpräparation mit ca. 0,1 mg Poly-L-Lysin (PLL; 22,1 kDa) versetzt und für 10 min bis 2 h bei Raumtemperatur inkubiert (genaue Angaben im Ergebnisteil). Als Reaktionsgefäße werden Braunglasfläschchen verwendet. Die Komplexierung wird direkt vor der Herstellung der Virosomen durchgeführt.

- **Rekonstitution der Virosomen durch Entfernung des Detergens**

Virusüberstand, Lipidlösung und DNA-Lösung werden gemischt und unter leichtem Schütteln 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Volumina der jeweiligen Lösungen werden im Ergebnisteil bei den Versuchen aufgeführt.

Entfernung des Detergens mittels Dialyse

Um den Übergang des Detergens von der Mizellarform in die monomere Form zu gewährleisten, muss das Detergens auf Konzentrationen unterhalb der kritischen

3. Material und Methoden

Mizellarkonzentration (CMC) verdünnt werden. Durch die Zugabe von Adsorbentien zum Dialysepuffer wird die Dialyserate gesteigert, was besonders für Detergenzien mit niedriger CMC von Bedeutung ist (*Furth, 1980*).

Als Adsorbens werden BioBeads SM2 verwendet. Diese werden durch Inkubation in 100%igem Methanol für 10 min aktiviert und durch mehrfaches Waschen mit Aqua dest. bei RT equilibriert. Ein Gramm BioBeads SM2 adsorbiert etwa 70 mg Triton X-100.

10 cm des Dialyseschlauches Visking (MWCO 14000; Roth, Karlsruhe) werden 30 min in 10 mM EDTA-Lösung gekocht und dann mit 1200 µl Virus-Lipid-DNA-Mischung befüllt und an den Enden mit Klammern verschlossen. Die BioBeads SM2 werden nach Angaben des Herstellers aktiviert, abgewogen und zusammen mit dem Dialyseschlauch in 0,5 l PBS gegeben. Nach 72 h Inkubation bei 4°C unter permanentem Rühren wird die Lösung aus dem Dialyseschlauch entnommen und bis zur Verwendung in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei 4°C aufbewahrt.

Adsorptionsmethode

Bei der Adsorptionsmethode wird das Adsorbens direkt zur Mizellarlösung gegeben. Die BioBeads SM2 werden, wie oben beschrieben, aktiviert und die verwendete Menge nach Angaben des Herstellers berechnet. Während der Inkubation werden die Lösungen bei 1400 rpm auf einem Thermoblock geschüttelt. Die zugrunde liegenden Schemata, mit Quellen, sind in **Tabelle 6** dargestellt.

Tabelle 6: Inkubationsschemata mit BioBeads SM2 zur Entfernung von Triton X-100 bei der Rekonstitution.

Dauer	3 x 24 h	72 h	4h und 16h	3 x 2h
BioBead-Menge/ Temp.	3x 1/3 der Menge, 4°C	vollständig, 4°C	1/3, 2/3 der Menge, 21°C	1/4, 1/4, 1/2 der Menge, 21°C
Quelle	<i>Markgraf et al., (2001)</i>	<i>Mukhlis et al., (1984)</i>	<i>Vainstein et al., (1984)</i>	<i>Baljinnyam B (2003)</i>

Nach der Detergensextraktion wird die Virosomenlösung mit Spritze und Kanüle entnommen (Braun, Melsungen) und bei 100.000 x g, 4°C für 60 min zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und das Pellet in 500 µl PBS resuspendiert. Der gesamte Waschvorgang wird zweimal wiederholt und am Ende auf 700 µl mit PBS aufgefüllt.

Nach Beendigung der Präparation werden die Virosomen bis zu ihrer Verwendung maximal für 7 Tage bei 4°C aufbewahrt.

Bestimmung des Tritongehaltes nach Detergensextraktion

Die Bestimmung des Tritongehaltes der Proben erfolgt photometrisch (*Holloway, 1973*).

Triton X-100 (20%) wird auf eine Konzentration von 1% mit PBS verdünnt. Eichlösungen mit Werten zwischen 0 und 1% Triton werden hergestellt. Um sowohl Proben als auch die Eichlösungen gleich zu behandeln, werden sie einer Proteinfällung durch Chloroform-Methanol unterzogen. Hierzu werden 150 µl Probe mit 600 µl Methanol (reinst) und 200 µl Chloroform (reinst) versetzt und 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert (Biofuge 28 RS, Eppendorffrotor #3740). Der Überstand wird abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

500µl des Überstandes werden in eine kleine Quarzglas-Küvette gegeben und die Extinktion photometrisch bei einer Wellenlänge von 275 nm bestimmt (UV-1202 Spektrometer, Shimadzu, Japan).

3.2.3. Biochemische Charakterisierung der Virosomen und Spermien

- **Proteinanalyse**

SDS-PAGE

Zur Auftrennung der Proteine nach dem Molekulargewicht wird die diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) angewendet. Das anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert die Proteine und lagert sich gleichmäßig durch hydrophobe Wechselwirkungen an die Polypeptidkette an. Die bestehenden Eigenladungen des Proteins werden überdeckt.

10 µl der Virus-/Virosomenproben werden mit 5 µl reduzierendem (31,25 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% Glycerin, 3% SDS, 0,5% Bromphenolblau, 5% Mercaptoethanol) oder nicht-reduzierendem (ohne Mercaptoethanol) Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert. Um unlösliche Bestandteile zu entfernen werden die Proben 10 min bei 14.000 rpm zentrifugiert (Tischzentrifuge Hettrich, Tübingen). Die Auftrennung erfolgt mittels eines 12%igen Trenngels nach Durchlaufen eines 5%igen Sammelgels. Zur Größenbestimmung der Proteine wird der PeqGold prestained Marker (peqLab, Erlangen) mitgeführt.

3. Material und Methoden

Die Banden werden entweder mittels Silberfärbung nach *Blum et al. (1986)* oder Coomassie-Färbung (227 ml Ethanol, 46 ml Eisessig, 1,25 g Coomassie Blue R250, ad 500 ml Aqua bidest.) sichtbar gemacht. Die überschüssigen Farbpigmente bei der Coomassie-Färbung werden durch ein Ethanol (10%)/Eisessig (10%)-Gemisch entfernt. Zur Aufbewahrung werden die Gele getrocknet.

- **Lipidanalyse**

Extraktion der Lipide

Die Extraktion der Lipide erfolgt nach dem Protokoll von *Bligh und Dyer (1959)*. Hierfür wird ein Aliquot der Virosomensuspension mit Aqua dest auf 400 µl verdünnt. Der Suspension werden 500 µl Chloroform und 1000 µl Methanol zugesetzt und für eine Minute gemischt. Erneut werden 500 µl Chloroform, 500 µl Methanol und ein Tropfen 1 N Salzsäure zugesetzt und erneut gemischt. Nach Zentrifugation bei 10.000 x g bei 4° C für 10 min wird die untere, organische Phase in eine Glasküvette überführt (Hermann Kröpke GmbH, Berlin). Um Reste der Lipide zu extrahieren wird die Probe der beschriebenen Prozedur erneut unterworfen. Das organische Lösungsmittel wird unter einem leichten Stickstoff-Strom durch Evaporation entfernt, wobei ein Liebisch Thermochem-Metallblock-Thermostat/Multiplex-Ventil-Depot (Gebr. Liebisch GmbH und Co., Bielefeld) verwendet wird.

Die Bestimmung der Phospholipidkonzentration im jeweils extrahierten Aliquot wird nach *Böttcher et al. (1961)* durchgeführt, die Quantifizierung des Cholesterols erfolgt mithilfe des Boehringer Mannheim Colorimetrischen Kits (R-Biopharm AG, Darmstadt).

- **DNA-Analyse**

Isolierung von DNA aus Virosomen

30 µl einer Virosomenpräparation werden mit 3 µl DNase I (1 mg/ml) versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss werden 3,3 µl einer 20%igen SDS-Lösung zugegeben und für 20 min bei RT inkubiert.

Die DNA wird mittels Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert. Hierfür werden die Proben mit 50 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,6, 1 mM EDTA) aufgefüllt und abschließend werden 25 µl Phenol (Roth, Karlsruhe) zugegeben. Die Proben werden gemischt und zentrifugiert (14.000 rpm, 2 min; Eppendorf Centrifuge 5417 R, Rotor: FA 45-30-11). Die obere, wässrige Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 25 µl Chloroform erfolgt

eine erneute Zentrifugation (s. o.). In einem neuen Reaktionsgefäß werden der oberen Phase 4 µl Natriumacetat und 100 µl Ethanol zugesetzt. Nach Durchmischung der Lösung folgt eine Inkubation bei -70°C für 15 min, anschließend wird die Probe zentrifugiert (4°C , 15 min und 14.000 rpm), der Überstand verworfen und das Pellet mit 70%igem Ethanol überschichtet. Im letzten Schritt der Aufreinigung wird bei 4°C und 14.000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig entfernt, und um den restlichen Alkohol zu entfernen, wird das Pellet bei 37°C getrocknet. Zur Resuspendierung werden 20µl TE-Puffer (pH 7.6) verwendet.

Isolierung von DNA aus Spermien

10 µl einer Spermien- bzw. Embryonensuspension werden in einem 2,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) mit 1000 µl TE-Puffer (pH 8.0) gemischt und 10 min bei RT und 13.000 rpm (Eppendorf Zentrifuge 5417 R, FA 45-30-11v) zentrifugiert. Die vorherigen Schritte werden dreimal wiederholt und der Überstand jeweils verworfen. Das Pellet wird mit 60 µl Lysepuffer (25 µl 1 M Tris/HCl, pH 8.0, 50 µl 5 M NaCl, 100 µl 0,25 M EDTA, 50 µl Mercaptoethanol, ad 2,5 ml mit Aqua bidest.) resuspendiert und 1 h bei 55°C inkubiert. Nach Zugabe von 2 µl Proteinase K-Lösung (10 mg/ml;Sigma-Aldrich, Steinheim) und 18 µl 5% SDS-Lösung, erfolgt eine Inkubation des Gemisches 2 h bei 55°C ; nach der Hälfte der Zeit erfolgt eine erneute Zugabe von 2 µl Proteinase-K-Lösung. Zur Inaktivierung dieser wird die Probe für 10 min bei 95°C gekocht. Die SDS-Konzentration wird durch Zugabe von 20 µl einer 5 M NaCl-Lösung verringert. Es folgt eine Zentrifugation bei 13.000 rpm und RT für 15 min. Der Überstand wird abgenommen und in einem neuen Reaktionsgefäß mit dem 2,5-3fachen Volumen eiskalten Ethanols gemischt. Nach Inkubation über Nacht bei -20°C werden die Proben für 15 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird mit 70%igem eiskaltem Ethanol gewaschen und erneut 15 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Alkohol wird dekantiert und das Pellet in 100µl TE-Puffer resuspendiert. Zur Verdunstung des Restalkohols wird das Reaktionsgefäß für 20 min bei 40°C mit offenem Deckel inkubiert.

Bestimmung des Gehaltes an EGFP-DNA mit der Realtime-PCR

Die EGFP-PCR wurde unter Verwendung eines Primersets durchgeführt, welches die das EGFP-Gen flankierenden Stellen im CX-EGFP-Plasmid abdeckt. Der 5'-Primer hat die Sequenz AGA ATT CGC CAC GGT GAG C und der 3'-Primer hat die Sequenz: TGA ATT CTT GTA CAG CTC GTC C. Es wird ein PCR-Produkt von 736 bp Länge erwartet.

3. Material und Methoden

Die quantitative Realtime PCR wurde in einem Mx3000P Realtime PCR-Cycler (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) durchgeführt, unter Verwendung des Stratagene Brilliant SYBER Green PCR Master Mixes (Stratagene) nach Angaben des Herstellers. Alle PCR-Reaktionen wurden in einer 96-Well Microtiter Platte (Stratagene) durchgeführt. Sowohl von dem 5'- als auch von dem 3'-Primer wurden jeweils 300 nM eingesetzt und 2,5 µl der zu untersuchenden Probe wurden in einem 25µl Ansatz verwendet. Die Fluoreszenz wurde automatisch während der PCR bestimmt. Nach einer initialen Denaturierung für 10 min bei 95°C folgten vierzig Zyklen mit Anlagerung für 60 sec bei 60° C, 30 sec Verlängerung (72° C) und 30 sec bei 95° C.

Um nachzuweisen, dass nur das spezifische Produkt amplifiziert wurde, wurde eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt, hierbei wurden die Proben nach dem letzten Zyklus auf 55°C abgekühlt und dann auf 95°C erhöht, mit 0,2°C/sec. Die Spezifität des PCR-Produktes, basierend auf der vorhergesagten Fragmentgröße, wurde ebenfalls mit Agarosegelelektrophorese detektiert. Alle Proben wurden im Doppelansatz getestet und der Mittelwert wurde für die weiteren Kalkulationen verwendet. Bei jedem Lauf war auch eine Negativkontrolle ohne DNA-Template enthalten.

- **Abbau von Neuraminsäureresten an Spermien durch Neuraminidase**

Endständige Neuraminsäurereste dienen Influenza-Hämagglutinin als Rezeptoren, durch die das Virus in die Lage versetzt wird, sich an die Zelle zu binden. Werden durch vorherige Inkubation der Zielzellen mit Neuraminidase die endständigen Neuraminsäurereste entfernt, kann eine Bindung und damit auch die nachfolgende Fusion nicht mehr stattfinden.

Hierfür werden die gefrierkonservierten Bullenspermien in 900µl Kapa-Medium ohne BSA aufgetaut, vor Zugabe der Virosomen 3 h mit 70 µl Neuraminidase (10 U/ml; Sigma-Aldrich, Steinheim) bei 38°C inkubiert und anschließend bei 1.100 g, 28°C für 8 min zentrifugiert. Das Pellet wird in 1ml Kapa-Medium resuspendiert.

- **Abbau von Neuraminsäureresten und exogener DNA an Spermien nach Virosomenfusion**

Da nicht alle Virosomen, die an die Spermien gebunden haben, mit diesen auch fusionieren, wird ein Neuraminidase-Verdau mit anschließendem Waschschrift an die Fusion angeschlossen. Hierdurch werden an Spermien gebundene Virosomen gelöst.

70 µl der mit Virosomen fusionierten Spermien werden mit 30 µl Neuraminidase (10 U/ml) für 1 h bei 38°C inkubiert und dann bei 1.100 x g, 28°C für 8 min (Heraeus Biofuge 28 RS, 3751 Rotor) zentrifugiert.

Um sicher zu gehen, dass es sich bei der durch die Realtime PCR detektierten EGFP-DNA um in die Spermien integrierte Moleküle handelt, werden die Spermien nach dem Neuraminidase-Verdau noch mit DNase I inkubiert. Dieses Enzym baut bei einer Temperatur von 37°C jede DNA ab, die in der Lösung enthalten ist. In Spermien inkorporierte DNA ist durch die Spermienmembran vor der DNase I geschützt und kann so, wie auch die genomische DNA, nicht abgebaut werden.

50 µl der Neuraminidase-verdauten, fusionierten Spermien werden für 1 h mit 5 µl DNase I (1 mg/ml; Roche, Mannheim) bei 37°C inkubiert und die DNase I durch Zugabe von 16 µl EDTA (50 mM, pH 8,0; Sigma-Aldrich, Steinheim) und zehninminütige Inkubation bei 75° C inaktiviert.

3.2.4. Elektronenmikroskopie der Virosomen

100 µl einer Virosomensuspension werden 1:1 mit einer 3%igen Glutardialdehyd-Lösung (Roth, Karlsruhe) gemischt und mindestens 4 h bei 4°C inkubiert. Die Virosomen werden für 5 min auf ein Karbon-beschichtetes Netz gegeben, mit 2% wässriger Uranylacetat-Lösung oder 1-2 % Phosphotungstic Säure (pH 6.5) negativ gefärbt. Die Netze werden an der Luft getrocknet und dann in einem Elektronenmikroskop (Zeiss EM 902A) bei 80 kV betrachtet.

3.2.5. Fusion mit Spermien

- **Fusion mit kryokonservierten Bullenspermien**

Influenza-Viren binden sich über Influenza-Hämagglutinin an Zielzellen und werden dort endozytotisch aufgenommen. Die Endosomen, in deren Lumen das Virus eingeschlossen ist, fusionieren mit Peroxisomen, die den pH-Wert auf 5 senken. Dies schafft die Bedingungen, die das Influenza-Virus benötigt, um mit der endosomalen Membran zu fusionieren und sein Genom in die Zielzelle zu entlassen. Dieser Mechanismus wird bei Influenzavirosomen genutzt, indem Influenza-Hämagglutinin die Gelegenheit erhält, sich an die Zielzelle zu

3. Material und Methoden

binden und anschließend der pH-Wert des Mediums auf 5 gesenkt wird. Die Influenzavirosomen fusionieren mit der Zielzelle und entlassen ihren Inhalt in diese.

Ein Pellet kryokonservierter Bullenspermien (ca. 40×10^6 Spermien in 0,1 ml; IFN Schönow e.V., Bernau) wird in 900 μ l Kapazitationsmedium ohne BSA (modifiziertes Tyrodemedium ohne Ca^{2+} : NaCl 112 mM, KCl 2,7 mM, NaHCO_3 25 mM, NaH_2PO_4 0,4 mM, Na-Laktat 10 mM, MgCl_2 0,5 mM, HEPES 5 mM, Glucose 13,8 mM, Na-Pyruvat 1 mM, BSA 0,6% w/v) aufgetaut (38°C, 10 min). Die Spermiesuspension wird bei 1.100 x g, 28°C für 8 min zentrifugiert (Heraeus Biofuge 28 RS, 3751 Rotor), der Überstand abgesaugt und die Spermien vorsichtig mit 25 μ l Virosomensuspension gemischt. Es wird vorsichtig mit 900 μ l Kapazitationsmedium ohne BSA überschichtet. Nach 45 min Inkubation bei 38°C („swim-up“) nimmt man den Überstand mit den motilen Spermien ab. Der pH-Wert der Lösung wird mit Zitronensäurepuffer (0,1 M Zitronensäure, 0,2 M Di-Natriumhydrogenphosphat auf pH 4,5 eingestellt) für 5 min unter Kontrolle auf pH 5,1 gesenkt. Unter Verwendung von 8 ml Kapazitationsmedium mit BSA (0.6%) wird die Lösung reneutralisiert und die Spermien durch Zentrifugation bei 1.100 x g, 28°C für 8 min konzentriert. Der Überstand wird abgesaugt und das Pellet für weitere Analysen verwendet (**Abbildung 4**: Zeitlicher Versuchsablauf).

- **Fusion mit bovinen Nebenhodenschwanzspermien**

Isolierung von bovinen Nebenhodenschwanzspermien aus Hoden von Schlachttieren

Die Hoden von frisch geschlachteten Bullen werden vorsichtig aus ihren Hüllen befreit, Nebenhodenkopf und –schwanz mit Schere und Pinzette vorsichtig abpräpariert und jeweils mit einem Scherenschlag vom Nebenhodenkörper getrennt. Beide werden in Hank's Salzlösung (HSS; Gibco) gewaschen.

Binde- und Fettgewebe werden abgetrennt und Nebenhodenschwänze und –köpfe mit so wenig Bindegewebe und Blutgefäßen wie möglich in kleine Stückchen geteilt und in HSS mit der Schere klein geschnitten. Dabei werden die Spermien in das Medium ausgepresst.

Durch 4 Lagen kreuzweise übereinandergelegten Zellstoff wird die Flüssigkeit in einen Messzylinder abgeseiht. Die in der Schale zurückbleibenden Gewebestücke werden mit einem Becherglas und ein wenig HSS erneut ausgedrückt und durchgeseiht. Der Vorgang wird zweimal wiederholt. Zum Schluss wird der Zellstoff mit den darin enthaltenen Gewebeteilen vorsichtig ausgewrungen.

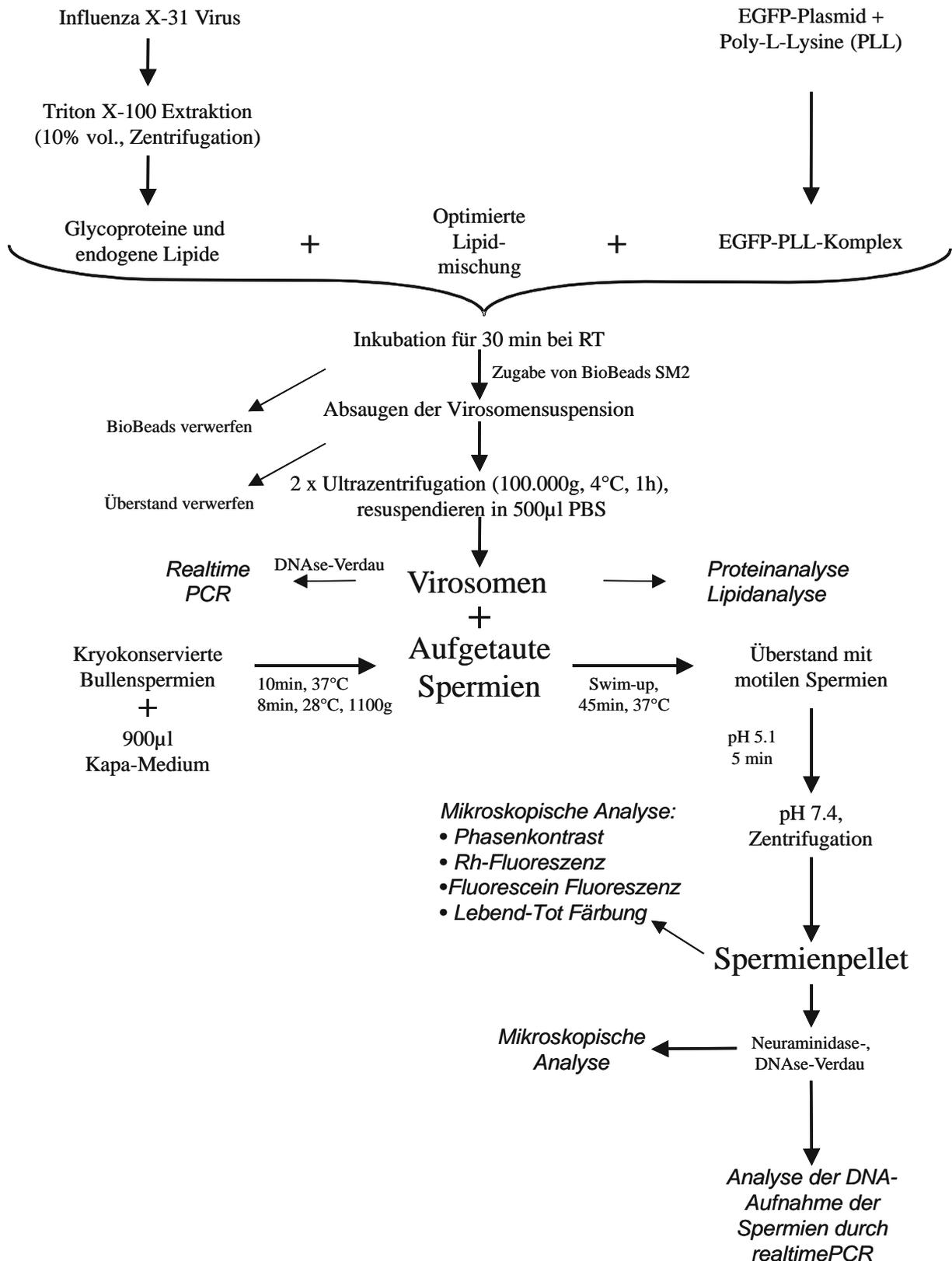


Abbildung 4: Schematischer Versuchsablauf zur Präparation von Virosomen und deren Nutzung für die Übertragung eines Marker-Plasmids in Spermien (modifiziert nach *Ponimaskin et al., 2000*).

3. Material und Methoden

Die Spermisuspension wird bei 600 x g, 10 min, 25° C zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt, das Pellet vorsichtig in HSS (10 ml) resuspendiert und auf 50 ml mit HSS aufgefüllt. Der Waschvorgang wird wiederholt und das Medium abgesaugt und verworfen.

Fusion mit bovinen Nebenhodenschwanzspermien

50 µl Nebenhodenschwanzspermien ($2,9 \times 10^9$ Spermien/ml) werden in 1000 µl Kapazitationsmedium suspendiert und mit 50 µl Inflenzavirosomen für 45 min bei 38°C inkubiert. 2 ml Zitronensäurepuffer (pH 4,5, 38°C) werden zugegeben und 5 min inkubiert. Die pH-Wert-Absenkung wird kontrolliert. Zur Reneutralisierung werden 3,5 ml Kapazitationsmedium zugesetzt. Nach einer Zentrifugation bei 1.100 x g, für 8 min bei 38°C wird der Überstand entfernt und das Pellet in 100 µl Kapazitationsmedium resuspendiert. Die Spermien werden für die weiteren Untersuchungen verwendet.

- **Fusion mit flüssigkonservierten Eberspermien**

Von dem flüssigkonservierten Ebersperma (IFN Schönow e.V., Bernau) werden 4,5 ml ($2-3,5 \times 10^9$ Spermien/ml) abgenommen und bei 500 x g für 6 min bei 20°C (Heraeus Biofuge 28 RS, 3751 Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig entfernt und dem Pellet werden 50µl im Verhältnis 1:1 mit PBS verdünnte Virosomen zugesetzt und die Lösung vorsichtig mit 2 ml BTS überschichtet. Die Spermien werden bei 38°C für 45 min inkubiert, anschließend der pH-Wert der Lösung unter Kontrolle durch Zugabe von 2,7 ml Zitronensäurepuffer auf 5,1 gesenkt. Es wird für 5 min bei 38° C inkubiert. Je 2,5 ml der Lösung werden in ein neues Röhrchen überführt und der pH-Wert durch Zugabe von jeweils 8ml BTS reneutralisiert. Die Spermisuspensionen werden anschließend bei 500 x g, für 6 min bei 20°C zentrifugiert und für weitere Untersuchungen verwendet.

3.2.6. Fluoreszenzmikroskopie fusionierter Spermien

Die mit Virosomen fusionierten Spermien werden in Reaktionsgefäße überführt und bis zu ihrer Verwendung in einem Brutschrank bei 38°C aufbewahrt.

Zum Mikroskopieren werden 5 µl der Spermisuspension auf einem Objektträger mit 5 µl einer Gebrauchslösung des Lebend-Tot-Farbstoffes Bisbenzimid H 33258 vermischt und mit einem ca. 1 cm² Deckgläschen bedeckt.

In einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert 100) wird das Präparat bei einer Vergrößerung 40-100 x betrachtet. Es werden jeweils drei Bilder von einem Ausschnitt angefertigt. Das Präparat wird höchstens 5 min verwendet, bevor es durch ein neues ersetzt wird.

Bei den Bildern handelt es sich: 1. um eine Darstellung in der Phasenkontrast-Ansicht. Alle im Ausschnitt vorhandenen Spermien sind sichtbar. 2. Eine Darstellung bei einer Anregung von 380/30 nm und einer Emission von 465/30 nm. Die Köpfe der toten, d.h. mit Hoechst 33258 angefärbten Spermien, erscheinen blau. In der dritten Darstellung wird Rhodamin-PE (Rh-PE; Exzitation: 580/20 nm, Emission: 630/60 nm) sichtbar. Mit dieser Aufnahme kann der Übergang des Lipidmarkers von der Virosomenmembran auf die Spermienmembran beurteilt werden. Aggregate nicht fusionierter Virosomen sind hierbei als rot leuchtende Punkte zu sehen. Ist das Rh-PE auf die Spermienmembran übergegangen, wird dies anhand der homogenen roten Färbung der Spermien erkannt. Diese Färbung ist weniger intensiv und kann sich auch nur auf Teilbereiche des Spermiums (wie z. B.: Kopf, Hauptstück des Schwanzes usw.) beziehen.

Um zu ermitteln wie viele der Spermien leben und mit Virosomen fusioniert sind, bzw. Virosomen gebunden haben, werden diese drei Aufnahmen im Computer übereinander montiert (Programm Photoshop). Durch Variation der Transparenz der drei Ebenen kann genau differenziert werden, wo sich ein Spermium befindet, ob dieses lebend oder tot ist und ob es eine punktförmige Rh-Fluoreszenz, eine homogene Rh-Fluoreszenz oder beide zeigt (**Abbildung 5**). Die Einteilung der Spermien erfolgt in sechs verschiedene Klassen abhängig von ihrer Fluoreszenz (s. **Tabelle 7**). Es werden bis zu 30 dieser 3er Aufnahmen mit insgesamt mindestens 200 Spermien von einer Probe ausgewertet. Gleiches gilt für Neuraminidase-verdaute Spermien.

In den Tabellen des Ergebnisteils werden die prozentualen Anteile der lebenden Spermien (% Lebend) an der Gesamtheit aller für diese Probe ausgezählten Spermien angegeben. Die Angaben „% fusioniert“, „% gebunden“ und „% nicht gebunden“ beziehen sich immer auf den Anteil der fusionierten/gebundenen/nicht gebundenen Spermien an der Gesamtheit der lebenden Spermien.

3.2.7. Statistik

Die statistischen Berechnungen wurden mithilfe des Programmes SPSS 11.0 durchgeführt. Um signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu untersuchen, wurde die Grundgesamtheit vor Anwendung eines Testes auf ihre Verteilung untersucht und daraufhin das statistische Testverfahren festgelegt. Jedoch konnte häufig keine statistische Untersuchung durchgeführt werden, da die Virosomenpräparationen pro Versuch nur einmal hergestellt wurden und häufig nicht mit früheren oder späteren Präparationen vergleichbar waren.

Tabelle 7: Einteilung der Spermien nach ihrer Fluoreszenz in der mikroskopischen Aufnahme.

	Lebende Spermien	Tote Spermien
fusioniert	Hoechst: Kopf unmarkiert	Hoechst: Kopf markiert
	Rh-PE: Teile o. ganzes Spermium mit roter, homogener Fluoreszenz, evtl. zusätzlich noch punktförmige Rh-Fluoreszenz	Rh-PE: Teile o. ganzes Spermium mit roter, homogener Fluoreszenz, evtl. zusätzlich noch punktförmige Rh-Fluoreszenz
gebunden	Hoechst: Kopf unmarkiert	Hoechst: Kopf markiert
	Rh-PE: nur gepunktete Fluoreszenz an Spermien	Rh-PE: nur gepunktete Fluoreszenz an Spermien
nicht gebunden, nicht fusioniert	Hoechst: Kopf unmarkiert	Hoechst: Kopf markiert
	Rh-PE: keine Fluoreszenz an Spermien	Rh-PE: keine Fluoreszenz an Spermien

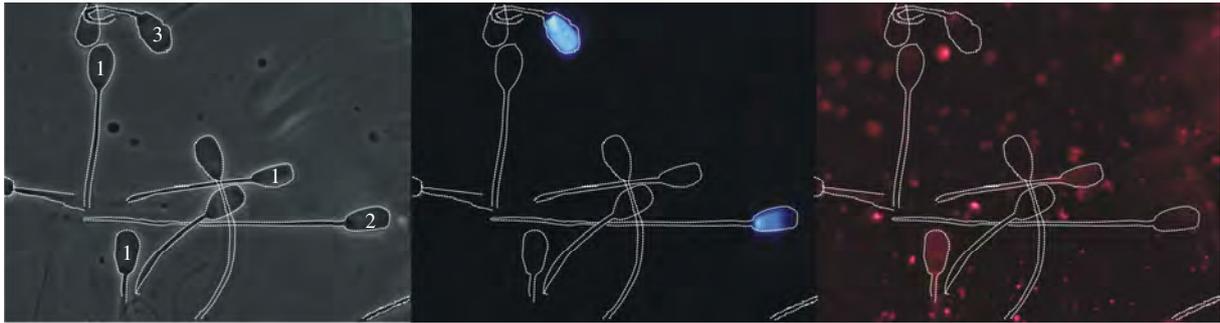


Abbildung 5: Mikroskopische Spermienbeurteilung. Durch Lokalisation der Spermien in der Phasenkontrastaufnahme (Links) kann in den zwei Fluoreszenzaufnahmen (Hoechst 33258, Mitte; RH-Pe, Rechts) jedes Spermium individuell angesprochen und beurteilt werden. 1: Spermien mit schwarzen Köpfen und homogener roter Fluoreszenz: lebend, fusionierte Spermien, 2: Spermium mit blauem Kopf, leichte, rote homogene Fluoreszenz: totes, fusioniertes Spermium, 3: Spermium mit blauem Kopf, ohne rote Fluoreszenz: totes Spermium, nicht gebunden.