

## **3 Eigene Untersuchungen**

### **3.1 Material und Methoden**

#### **3.1.1 Material**

##### **3.1.1.1 Tiere und Zellen**

###### **3.1.1.1.1 Tiere**

Gewebeproben von Hausschweinen wurden im Institut für Veterinär-Pathologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin im Rahmen der regulären Sektionen, im Institut für experimentelle Chirurgie der Charité Berlin sowie an kommerziellen Schlachthöfen gesammelt.

Blutproben wurden sowohl im Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin in der Klinik für Klautiere und dem Institut für Tierernährung, dem Institut für experimentelle Chirurgie der Charité Berlin, der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere in Tübingen, dem Paul-Ehrlich-Institut, im Rahmen von routinemäßigen Blutentnahmen durch die Tiergesundheitsämter wie auch an verschiedenen Schlachthöfen entnommen.

Weitere Blut- und Gewebeproben wurden von Instituten oder Firmen in Schweden, Frankreich, Italien, Spanien, der Schweiz und den USA zur Verfügung gestellt.

Die Proben von immunsupprimierten Schweinen wurden an der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere in Tübingen gewonnen.

Blut- und Gewebeproben von Wildschweinen stammen von bei der Jagd erlegten Tieren aus Brandenburg/Deutschland sowie Florida/USA.

Die Auswahl der mit der (modifizierten) Consensus-PCR untersuchten Proben erfolgte anhand zweier Kriterien. Sie sollten entweder von einem Zell- oder Gewebetyp stammen, in dem Herpesviren bekanntlich replizieren bzw. ihre Latenz ausbilden können, oder aber ein für die Xenotransplantation in Frage kommendes Organ oder Gewebe darstellen. Darüber hinaus wurden Organproben untersucht, die im Rahmen anderer Fragestellungen genommen wurden und somit verfügbar waren. Das Probenmaterial wurde Schweinen unterschiedlicher Herkunft, unterschiedlichen Alters und Geschlechts entnommen. 45 der Proben stammen von 5 Feten (Tod der

Muttersau während der Trächtigkeit bzw. Abort), sowie 39 Proben von Schweinen, welche mit Prednisolon immunsupprimiert worden waren (1.200mg i.m. an vier aufeinanderfolgenden Tagen). Von diesen 39 Proben wiederum wurden 29 von Schweinen gewonnen, welche vor der Immunsuppression experimentell mit Pseudorabies-Virus infiziert worden waren (17 Tiere, Blut- und Organproben). Die Entnahme der Proben erfolgte an verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion (3-21 Tage). Sie waren mit einer Pseudorabies-spezifischen PCR voruntersucht worden und hatten sich als negativ oder nur schwach positiv erwiesen. Die übrigen 10 Proben (nur Blutproben) wurden 3 bis 15 Tage nach Beginn der Immunsuppression gewonnen und stammen von insgesamt 4 Tieren.

### 3.1.1.1.2 Zellen

Folgende Zelllinien wurden verwendet:

	<u>Zellen</u>	<u>Zelltyp</u>	<u>Herkunft</u>
adhärent	PK-15	Schweineniere	Robert Koch-Institut
	ST	Schweinehoden	Robert Koch-Institut
	POEK	porcine embryonale Niere	Robert Koch-Institut
	WSH	Wildschweinhaut	erhalten von Dr. M. Büttner
	SE-R	Vollembryo Schwein	erhalten von Dr. R. Riebe
	293	humane embryonale Niere	Robert Koch-Institut
	Vero	Affenniere	Robert Koch-Institut
	MDBK	Rinderniere	Robert Koch-Institut
	primäre Zellen	Ferkelhaut und -lunge	isoliert von T. Leiskau
Suspension	L23	porcine B-Zellen	ECACC
	L52	porcine B-Zellen	ECACC
	B95-8	Krallenaffen-B-Zellen	erhalten von Dr. K. Borchers
	Molt 4/8	humane Lymphoblasten (CD4 <sup>+</sup> )	Robert Koch-Institut

### 3.1.1.2 **Antikörper, Konjugate und Seren**

Maus-anti-Immunglobulin (leichte Kette)	DPC Biermann, Bad Nauheim/D
Maus-anti-CD3 $\epsilon$	Southern Biotechnology, Birmingham/USA
Maus-anti-SWC3 (mAk 74-22-15)	Dr. A. Saalmüller, BFAV Tübingen/D

anti-Digoxigenin, AP-konjugiert	Roche Diagnostics, Mannheim/D
Ziege-anti-Maus IgG, FITC-konjugiert	Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove/USA
Ziege-anti-Maus IgG, MicroBead-konjugiert	Miltenyi Biotech, Auburn/USA
Ziegen-Gammaglobulin	Dianova, Hamburg/D
Fötales Kälberserum (FKS)	Life Technologies, Paisley/UK
Pferdenormalserum	Vectorlabs, Burlingame/USA

### 3.1.1.3 Chemikalien

AG 501-X8(D)	Bio-Rad, Hercules/USA
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt/D
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Merck, Darmstadt/D
Agarose für Gelelektrophorese	Roche Diagnostics, Mannheim/D Life Technologies, Paisley/UK
Agarose, niedrig schmelzend (LMP)	FMC Bioproducts, Rockland/USA
Ampicillin	Sigma, St.Louis/USA
Bacto-Agar	Difco, Detroit/USA
Bacto-Trypton	Difco, Detroit/USA
Bacto-Yeast-Extrakt	Difco, Detroit/USA
Bidestilliertes Wasser (H <sub>2</sub> O), DNase und RNase-frei	Fluka, Buchs/CH
Blockreagenz	Roche Diagnostics, Mannheim/D
Bovines Serum Albumin (BSA)	New England Biolabs, Beverly/USA
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg/D
CDP-Star, Ready-to-use	Roche Diagnostics, Mannheim/D
Concanavalin A	Sigma, St.Louis/USA
Cyclosporin A	Sigma, St.Louis/USA
Dexamethason	Sigma, St.Louis/USA
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt/D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt/D Sigma, St.Louis/USA
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Sigma, St.Louis/USA
Dithiothreitol	Life Technologies, Paisley/UK
Ethanol	Merck, Darmstadt/D

---

Ethidiumbromid	Biomol, Hamburg/D
Ethylendiamintetraacetylsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt/D
Ficoll 400	Sigma, St.Louis/USA
Formamid	Merck, Darmstadt/D
Glycerin	Merck, Darmstadt/D
Hi-Di-Formamid	Applied Biosystems, Foster City/USA
Hoechst H33258	Molecular Probes, Eugene/USA
Ionomycin	Sigma, St.Louis/USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt/D
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt/D
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO <sub>3</sub> )	Fluka, Buchs/CH
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma, St.Louis/USA
Lipopolysaccharide (LPS)	Sigma, St.Louis/USA
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt/D
Magnesiumdichlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt/D
β-Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg/D
	Merck, Darmstadt/D
Natrium-Butyrat	Sigma, St.Louis/USA
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt/D
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt/D
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt/D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt/D
N-Lauroylsarkosin	Sigma, St.Louis/USA
Phytohämagglutinin (PHA)	Sigma, St.Louis/USA
Pokeweed Mitogen	Sigma, St.Louis/USA
1% Prednisolon-21-acetat	Vetoquinol, Oberursel/D
Propanol	Merck, Darmstadt/D
Propidiumiodid	ICN Biomedicals, Ohio/USA
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt/D
Sucrose	Merck, Darmstadt/D
TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat)	Sigma, St.Louis/USA
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma, St.Louis/USA
Tumor Nekrose Faktor α (TNF-α), human	Sigma, St.Louis/USA
Tween 20	Merck-Schuchart, Hohenbrunn/D

X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid)      Biomol, Hamburg/D

### 3.1.1.4 Nukleinsäuren, Nukleotide und Marker

DNA aus Kalbsthymus	Boehringer, Mannheim/D
Oligo dT-Primer	Life Technologies, Paisley/UK
Random Hexamer-Primer	Life Technologies, Paisley/UK
$\phi$ X174 DNA- <i>Hae</i> III Digest	New England Biolabs, Beverly/USA
$\lambda$ DNA- <i>Hind</i> III Digest	New England Biolabs, Beverly/USA
1 kbp DNA ladder	New England Biolabs, Beverly/USA
pBR322 DNA- <i>Msp</i> I Digest	New England Biolabs, Beverly/USA

### 3.1.1.5 Enzyme

AmpliTaq Gold DNA-Polymerase	Applied Biosystems, Foster City/USA
DNase I	Roche Diagnostics, Mannheim/D
DNase I, RNase-frei	Roche Diagnostics, Mannheim/D
<i>Eco</i> RI	New England Biolabs, Beverly/USA
Pronase	Roche Diagnostics, Mannheim/D
RNase A	Qiagen, Valencia/USA
Superscript II Reverse Transkriptase	Life Technologies, Paisley/UK

### 3.1.1.6 Reagenziensätze (Kits)

ABI PRISM BigDye Terminators v2.0 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City/USA
DIG-High Prime	Roche Diagnostics, Mannheim/D
DIG Control Teststrips	Roche Diagnostics, Mannheim/D
DIG Wash and Block Buffer Set	Roche Diagnostics, Mannheim/D
DNA Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City/USA
DNeasy Tissue Kit	Qiagen, Valencia/USA
Expand High Fidelity PCR System	Roche Diagnostics, Mannheim/D
Expand Long Template PCR Kit	Roche Diagnostics, Mannheim/D
Multicolor Detection Set	Roche Diagnostics, Mannheim/D
PerfectPrep Gel Cleanup Kit	Eppendorf, Hamburg/D

PCR DIG Probe Synthesis Kit	Roche Diagnostics, Mannheim/D
QIAamp Ultrasens Virus Kit	Qiagen, Valencia/USA
QIAprep 8 Miniprep Kit	Qiagen, Valencia/USA
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Valencia/USA
RNase-free DNase Set	Qiagen, Valencia/USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Valencia/USA
TaKaRa Ex Taq PCR Kit	TaKaRa Biomedicals, Shiga/J
TaKaRa LA PCR Kit Ver.2.1	TaKaRa Biomedicals, Shiga/J
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Carlsbad/USA

### 3.1.1.7 Filter, Membranen und Säulen

Sterilfilter (0,2 und 0,45µm)	Schleicher & Schuell, Dassel/D
Vakuumfiltrationseinheit, 250ml und 500ml	Nalge Nunc International, Rochester/USA
Nylonmembran Hybond N <sup>+</sup>	Roche Diagnostics, Mannheim/D
MicroSpin Columns (S-300HR und S-400HR)	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala/SW
LS Separation Columns (MACS)	Miltenyi Biotech, Auburn/USA
QIAshredder spin columns	Qiagen, Valencia/USA

### 3.1.1.8 Kunststoffartikel

Cryogefäße	Nunc, Roskilde/DK
Einweg-Zellkulturgefäße	Nunc, Roskilde/DK
FACS-Röhrchen	Costar, Corning/USA
Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht/D
Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film	Roche Diagnostics, Mannheim/D
PCR-Pipettenspitzen mit Aerosolschutz	Molecular BioProducts, San Diego/USA
PCR-Pipettenspitzen ohne Aerosolschutz	Süd Laborbedarf, Gauting/D
PCR-Platten, 96-well (TaqMan)	ABgene, Epsom/UK
PCR-Reaktionsgefäße (0,2ml)	Eppendorf, Hamburg/D Applied Biosystems, Foster City/USA
Schweißfolien (TaqMan)	ABgene, Epsom/UK
Spritzen und Kanülen (Sterican)	Braun Melsungen, Melsungen/D

Reaktionsgefäße	0,5ml	Sarstedt, Nümbrecht/D
	1,5ml, 2ml	Eppendorf, Hamburg/D
	15ml, 50ml	Falcon, Oxnard/USA Greiner, Nürtingen/D
Ultrazentrifugengefäße		Beckman, Palo Alto/USA
96-well Mikrotiterplatten und Abdeckplatten		Greiner, Nürtingen/D

### 3.1.1.9 Geräte und Laborhilfsmittel

ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer		Applied Biosystems, Foster City/USA
ABI PRISM 377 DNA Sequencer		Applied Biosystems, Foster City/USA
Brutschränke für die Zellkultur		Heraeus, Osterode/D
Durchflusszytometer		Becton Dickinson, Franklin Lakes/USA
Feinwaagen		Sartorius, Göttingen/D
Fluorometer		Turner Designs, Sunnyvale/USA
Fotodokumentationsanlage		INTAS, Göttingen/D
Gefrierschränke	-80°C	Heraeus, Osterode/D Forma Scientific, Marietta/USA
	-20°C	Liebherr, Biberach an der Riß/D Bosch, Stuttgart/D
Gelelektrophoresesysteme, horizontal		Biometra, Göttingen/D
Glaswaren (Kolben, Pipetten etc.)		Brand, Wertheim/D
Hybridisierungsöfen		Biometra, Göttingen/D
Kühlschränke		Bosch, Stuttgart/D
		Liebherr, Biberach an der Riß/D
Lichtmikroskope		Zeiss, Jena/D
		Nikon, Tokio/J
Magnetisches Zellseparationssystem (MACS)		Miltenyi Biotec, Auburn/USA
Magnetrührer		IKA-Werk, Staufen im Breisgau/D
pH-Messgerät		Beckman, Palo Alto/USA
Photometer		Beckman Coulter, Fullerton/USA
Pipetten		Gilson, Columbus/USA
		Eppendorf, Hamburg/D
Röntgenfilmentwickler		AGFA, Mortsel/B
Röntgenkassetten		Rothhaar & Schroeder, Heidelberg/D

Spannungsgeräte	Biometra, Göttingen/D Hofer Scientific Instruments, San Francisco/USA Life Technologies, Paisley/UK
SpeedVac-Zentrifuge	Savant, Hicksville/USA
Thermocycler	Applied Biosystems, Foster City/USA Biometra, Göttingen/D
Tischzentrifugen	Labnet, Edison/USA
Transilluminator	Rothhaar & Schroeder, Heidelberg/D
Ultraschallgerät	Heinemann, Schwäbisch Gmünd/D
Ultrazentrifuge	Beckman, Palo Alto/USA
UV-Handlampe	Novodirect, Karlsruhe/D
UV-Bestrahlungsgerät Stratalinker	Stratagene, La Jolla/USA
Vakuum-Blotkammer	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala/SW
Vortex	Roth, Karlsruhe/D
Wasserbäder	GFL, Burgwedel/D Haake, Karlsruhe/D
Zählkammer	Brand, Wertheim/D
Zentrifugen	Heraeus, Osterode/D

### 3.1.1.10 Puffer und Lösungen

#### 3.1.1.10.1 Medien für Bakterien- und Zellkultur

Alle Pulvermedien wurde nach Anleitung des Herstellers angesetzt und sterilfiltriert

##### 3.1.1.10.1.1 Bakterienkultur

LB-Flüssigmedium	10g/l	Bacto-Trypton
	5g/l	Bacto-Yeast-Extrakt
	10g/l	NaCl
		pH 7,5 mit NaOH eingestellt
LB-Agar	17g/l	Bacto-Agar in LB-Flüssigmedium
SOC		Invitrogen, Carlsbad/USA



3.1.1.10.1.2 Zellkultur

D-MEM		Life Technologies, Paisley/UK
RPMI 1640		Life Technologies, Paisley/UK
Einfriermedium I	50%	D-MEM
	40%	FKS
	10%	DMSO
Einfriermedium II	90%	FKS
	10%	DMSO
Trypsin EDTA	0,25%	Trypsin
	3mM	EDTA in PBS, pH 7,2

3.1.1.10.2 Sonstige Lösungen und Puffer für Zellkultur und Virusanzucht

Ficoll-Paque / Ficoll-Paque Plus		Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala/SW
L-Glutamin		Sigma, St.Louis/USA
Natrium-Pyruvat		Sigma, St.Louis/USA
$\beta$ -Mercaptoethanol		Invitrogen, Carlsbad/USA
Penicillin-Streptomycin		Sigma, St.Louis/USA
PBS	140mM	NaCl
	2mM	KCl
	10mM	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
	2mM	$\text{KH}_2\text{PO}_4$
PBS/FKS	2% (v/v)	FKS in PBS
PBS/EDTA	2% (v/v)	FKS
	2mM	EDTA in PBS
RCLB (Red Cell Lysis Buffer)	155mM	$\text{NH}_4\text{Cl}$
	10mM	$\text{KHCO}_3$
	1mM	EDTA
		wurde 1:1 mit PBS verdünnt

Resuspensionspuffer I (10x)	500mM	Tris, pH 7,4
	50mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,05% (v/v)	Tween 20
Resuspensionspuffer II (10x)	500mM	Tris, pH 7,4
	100mM	MgSO <sub>4</sub>
	1mM	Dithiothreitol
	0,05% (v/v)	Tween 20
Sucrose-Lösung	30% (w/v)	Sucrose in TEN-Puffer, sterilfiltriert
Trypanblau-Lösung	0,25% (w/v)	Trypanblau in PBS

### 3.1.1.10.3 PCR

MgCl <sub>2</sub>		Applied Biosystems, Foster City/USA
Nukleotidmix	dNTP	Applied Biosystems, Foster City/USA
		Hybaid, Ashford/UK
		Roche Diagnostics, Mannheim/D
		TaKaRa Biomedicals, Shiga/J
	dNTP + dUTP	Applied Biosystems, Foster City/USA
PCR-Puffer		Applied Biosystems, Foster City/USA
		Roche Diagnostics, Mannheim/D
		TaKaRa Biomedicals, Shiga/J
TaqMan Universal PCR Master Mix		Applied Biosystems, Foster City/USA

### 3.1.1.10.4 Gelelektrophorese

Ethidiumbromid-Lösung	10g/l	Ethidiumbromid
Laufpuffer, Standardgel	2x	TBE
	0,4µg/ml	Ethidiumbromid
Laufpuffer, Gardella-Gel	1x	TBE
Lysispuffer, Gardella-Gel	5% (w/v)	Ficoll 400
	1% (w/v)	SDS
	1mg/ml	Pronase (frisch zugesetzt)

Natriumphosphatpuffer	10mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,0
Probenpuffer, Standardgel	7 Teile	70% Sucrose
	5 Teile	Bromphenolblau-Lsg., gesättigt in H <sub>2</sub> O
Probenpuffer, Gardella-Gel	15% (w/v)	Ficoll 400
	2U/ml	RNase A in 1x TBE
TBE-Puffer (10x)		Life Technologies, Paisley/UK

### 3.1.1.10.5 Transfer-, Hybridisierungs- und Vorhybridisierungslösungen

Blockreagenz	100g/l	Blockreagenz in H <sub>2</sub> O bei 60°C unter Rühren gelöst, autoklaviert und bei -20°C gelagert
Denaturierungspuffer	0,5N	NaOH
	1,5M	NaCl
Depurinierungspuffer	0,25N	HCl
Hybridisierungsmix	50%	Formamid, deionisiert
	5x	SSC
	2% (w/v)	Blockreagenz
	0,1% (w/v)	N-Lauroylsarkosin
	0,02% (w/v)	SDS
	0,1mg/ml	Kalbthymus-DNA, denaturiert
Transferpuffer	1M	Ammoniumacetat

### 3.1.1.10.6 Sonstige Puffer und Lösungen

Dextranblau-Lösung	20mg/ml	Dextranblau in H <sub>2</sub> O, sterilfiltriert
First Strand Puffer, 5x		Life Technologies, Paisley/UK
Messlösung Fluorometer	0,1µg/ml	H33258 in 1x TNE-Puffer, pH 7,4
Natriumacetat-Lösung, 3M	246,09g/l	Natriumacetat, pH 4,8
SDS-Lösung	10% (w/v)	SDS

SSC, 20x		Sigma, St.Louis/USA Life Technologies, Paisley/UK
TE-Puffer	10mM 1mM	Tris/HCl, pH 8,0 EDTA
TEN-Puffer	10mM 1mM 150mM	Tris/HCl, pH 7,4 EDTA NaCl
TNE-Puffer (10x)	100mM 10mM 1M	Tris/HCl, pH 7,4 EDTA NaCl
Tris/HCl-Lösung, 2M	242,28g/l	Tris, pH mit HCl eingestellt
X-Gal-Lösung	40mg/ml	X-Gal in Dimethylformamid

### 3.1.1.11 Verwendete Software

AutoAssembler 2.1	Applied Biosystems, Foster City/USA
ABI PRISM DNA Sequencing Analysis 3.7	Applied Biosystems, Foster City/USA
BBEdit Lite 6.1.2	Bare Bones Software, Bedford/USA
BetterTelnet 2.0	Freeware <sup>1</sup>
Biolmage Intelligent Quantifier 2.1.2a	B.I.Systems Corp., Ann Arbor/USA
CellQuest 3.3	Becton Dickinson, Franklin Lakes/USA
EndNote 5	ISI ResearchSoft, Berkeley/USA
Factura 2.2	Applied Biosystems, Foster City/USA
Fetch 3.0.3	Shareware <sup>2</sup>
FileMaker Pro 4.0 und 5.0	FileMaker Inc., Santa Clara/USA
Freehand 8.0.1	Macromedia Inc., San Francisco/USA
MacVector 7.0	Symantec Corp., Cupertino/USA
Microsoft Office Paket 2001	Microsoft Corp., Redmond/USA
Netscape Navigator 4.5	Netscape Communications Corp., Mountain View/USA
Photoshop 5.0	Adobe Systems Incorporated, San Jose/USA

PHYLIP 3.5	J.Felsenstein <sup>3</sup>
Primer Premier 4.0	Premier Biosoft International, Palo Alto/USA
Sequence Detector 1.6.3	Applied Biosystems, Foster City/USA

<sup>1</sup> <http://www.cstone.net/~rbraun/mac/telnet/>

<sup>2</sup> <http://www.dartmouth.edu/pages/softdev/>

<sup>3</sup> <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>

### 3.1.1.12 GenBank-Nummern der verwendeten Virussequenzen

#### 3.1.1.12.1 Alphaherpesviren

BoHV-1 (Bovines Herpesvirus 1):	Z78205
BoHV-2 (Bovines Herpesvirus 2):	AF181249
CoHV-1 (Columbides Herpesvirus 1):	AF141890
	( + unveröffentlichte Daten von C. Grund, B. Ehlers , M. Goltz)
EHV-1 (Equines Herpesvirus 1):	M86664
EHV-4 (Equines Herpesvirus 4):	AF030027
FeHV (Felines Herpesvirus):	AJ224971
GaHV-2 (Gallides Herpesvirus 2):	L40431
HSV-1 (Herpes Simplex Virus 1, Humanes Herpesvirus 1):	X04771
HSV-2 (Herpes Simplex Virus 2, Humanes Herpesvirus 2):	Z86099
PRV (Pseudorabies-Virus, Suid Herpesvirus 1):	L24487
VZV (Varizella-Zoster-Virus, Humanes Herpesvirus 3):	X04370

#### 3.1.1.12.2 Betaherpesviren

CaHV-2 (Caviides Herpesvirus 2):	L25706
CeHV-8 (Cercopithecines Herpesvirus 8):	AF033184
EiHV-1 (Elefanten Herpesvirus 1):	AF322977
HCMV (Humanes Cytomegalievirus, Humanes Herpesvirus 5):	X17403
HHV-6 (Humanes Herpesvirus 6):	X83413
HHV-7 (Humanes Herpesvirus 7):	U43400
MCMV (Murines Cytomegalievirus, Murines Herpesvirus 1):	U68299
MuHV-2 (Murines Herpesvirus 2):	U50550
PCMV (Porcines Cytomegalievirus):	AF268039

### 3.1.1.12.3 Gammaherpesviren

AlHV-1 (Alcelaphines Herpesvirus 1):	AF005370
BLHV (Bovines Lymphotropes Herpesvirus):	AF327830
BoHV-4 (Bovines Herpesvirus 4):	AF031811
CalHV-3 (Callithrichines Herpesvirus 3):	AF319782
CeHV-15 (Cercopithecines Herpesvirus 15):	AY037858
EBV (Epstein-Barr-Virus, Humanes Herpesvirus 4):	X00784
EHV-2 (Equines Herpesvirus 2):	U20824
HHV-8 (Humanes Herpesvirus 8):	U75698
HVA (Herpesvirus Ateles, Atelines Herpesvirus 3):	AF083424
HVS (Herpesvirus Saimiri, Saimirines Herpesvirus 2):	X64346
MHV-68 (Murines Gammaherpesvirus 68):	U97553
OvHV-2 (Ovines Herpesvirus 2):	AF327831
PLHV-1 (Porcines Lymphotropes Herpesvirus 1):	AF191042
PLHV-2 (Porcines Lymphotropes Herpesvirus 2):	AF191043
RhGHV (Rhinozeros Gammaherpesvirus):	AF287948
RFHV (Retroperitoneale Fibromatose-assoziiertes Herpesvirus):	AF005479
RRV (Rhesusaffen Rhadinovirus):	AF029302

## 3.1.2 Methoden

### 3.1.2.1 **DNA-Extraktion**

#### 3.1.2.1.1 DNA-Extraktion aus Gewebe

Gewebeproben wurden so frisch wie möglich präpariert und die Reste anschließend bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Für die Extraktion der DNA wurde der Qiagen DNeasy Tissue Kit gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet. 25mg bzw. 10mg (Milz) Gewebe wurden über Nacht bei  $56^{\circ}\text{C}$  in einem Lysis-Puffer mit Proteinase K verdaut. Nach Zugabe eines weiteren Puffers (AL) sowie Ethanol wurde die Probe auf eine Säule mit Silica-Gel-Membran appliziert. Im folgenden Zentrifugationsschritt bindet die DNA an die Membran, die im Anschluss zweimal mit ethanolhaltigen Puffern (AW1 + AW2) gewaschen wurde. Erst dann wurde die DNA mit einem niedrig-molaren Tris-Puffer (AE) eluiert. Die DNA-Lösungen wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.1.2.1.2 DNA-Extraktion aus Blut und Zellkulturzellen

Blutproben wurden zunächst für 10 Minuten bei 400xg zentrifugiert und anschließend die zwischen Erythrozyten und Plasma angereicherten Leukozyten abgenommen. 50-100µl dieser im weiteren als ‚Buffy Coat‘ bezeichneten Zellsuspension wurden dann zur DNA-Extraktion verwendet und der Rest bei –20°C gelagert. Die Extraktion der DNA erfolgte ebenfalls mit Hilfe des Qiagen DNeasy Tissue Kit gemäß den Anweisungen des Herstellers. Es wurden 50-100µl Buffy Coat mit PBS auf ein Volumen von 200µl gebracht. Nach einem 10-minütigen Verdau mit Proteinase K in einem Lysis-Puffer (AL) bei 70°C und der anschließenden Zugabe von Ethanol wurde die Lösung auf die Silica-Gel-Membran-Säule pipettiert, zentrifugiert, zweimal gewaschen und eluiert. Die Lagerung erfolgte bei –20°C.

Zellkulturzellen (ca.  $5 \times 10^6$ ) wurden zunächst in Suspension (d.h. nach Trypsinieren und Vereinzeln, falls adhärent wachsend) für 10 Minuten bei 300xg zentrifugiert, das Medium abgenommen und die Zellen in 200µl PBS resuspendiert. So konnten die Proben bei –20°C gelagert und in der DNA-Extraktion direkt verwendet werden. Die Extraktion der DNA erfolgte in gleicher Weise wie bei Blutproben.

### 3.1.2.1.3 DNA-Extraktion aus virushaltigen Zellkulturüberständen

Zur Gewinnung der DNA aus dem Viruspellet, das durch eine Ultrazentrifugation von Zellkulturüberständen erzeugt worden war [s. Kap. 3.1.2.15.1], wurden entweder ebenfalls der Qiagen DNeasy Tissue Kit (unter Verwendung von 2µg Kalbsthymus-DNA als Träger) oder aber der Qiagen UltraSens Virus Kit verwendet. Bei letzterem wird die nach Ultrazentrifugation und DNase-Behandlung erhaltene Lösung mit einem Puffer (AC) versetzt, der ein kationisches Detergenz enthält. Dieses Detergenz interagiert über seine geladenen Kopfgruppen mit den enthaltenen (viralen) Nukleinsäuren, und die dabei entstehenden Komplexe werden mittels einer Zentrifugation sedimentiert. Die Pellets wurden gemäß der Herstelleranleitung in Puffer AR aufgenommen, mit Proteinase K verdaut und nach Zugabe eines ethanolhaltigen Puffers (AB) auf QIAamp-Säulen mit Silica-Gel-Membran appliziert. Die gebundene DNA wurde mehrmals gewaschen und anschließend mit einem Niedrigsalzpuffer (AVE) eluiert. Die erhaltene Lösung wurde bei –20°C gelagert.

### 3.1.2.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem ‚QIAprep 8 Miniprep Kit‘ der Firma Qiagen gemäß der Anleitung des Herstellers. Etwa 1ml einer Über-Nacht-Bakterien-

kultur [s. Kap. 3.1.2.12] wurde in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert (13.000 rpm, 1 min) und das Bakterienpellet in Puffer P1 resuspendiert. Mit der Zugabe von Puffer P2 erfolgte die alkalische Lyse der Bakterien und damit die Freisetzung der Plasmid-DNA. Das im Puffer P2 enthaltene NaOH bewirkt dabei die Denaturierung von Zellbestandteilen und chromosomaler DNA. Nach Neutralisierung des Zell-Lysates mit Puffer N3 wurde das Lysat in einer Tischzentrifuge für 10 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die im Lysat enthaltenen denaturierten Proteine, die chromosomale DNA und restliche Zelltrümmer präzipitieren dabei als Salz-Detergenz-Komplexe. Der die Plasmid-DNA enthaltende Überstand kann abgenommen und auf die QIAprep 8 -Säulen appliziert werden, die zuvor in einer Vakuumapparatur installiert wurden. Nach Anlegen des Vakuums adsorbiert die Plasmid-DNA an die Silica-Gel-Membran, während RNA, Proteine und Metaboliten die Säule passieren, ohne zu binden. Nach zwei Waschschritten wurde die DNA mit Puffer EB eluiert. Um eventuelle Ethanolreste zu beseitigen, wurden die Proben in der SpeedVac-Zentrifuge bis zum Einfrieren zentrifugiert.

Die Plasmidisolierung wurde mittels einer Agarosegelelektrophorese der erhaltenen Lösung kontrolliert [s. Kap. 3.1.2.6.1]; die Auswahl eines Klons konnte nach Restriktionsverdau [s. Kap. 3.1.2.7.1] und Sequenzierung [s. Kap. 3.1.2.9] erfolgen.

### 3.1.2.2 RNA-Extraktion

Für die RNA-Extraktion wurden zunächst  $5 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 300xg in einer Tischzentrifuge pelletiert. Nach Entfernung des Mediums wurden die Zellen in dem Lysis-Puffer des Qiagen RNeasy Mini Kits nach Anweisung des Herstellers resuspendiert, wobei darauf zu achten war, dass die zunächst schleimige Lösung wieder dünnflüssig wurde. Erst dann konnten die lysierten Zellen unter Verwendung der QIAshredder Säulen durch Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für 2 Minuten homogenisiert und im Anschluss entweder sofort weiterverarbeitet oder aber bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren werden. Die eingefrorenen Zelllysate wurden nach spätestens vier Wochen weiterverarbeitet. Waren überzählige Zellen vorhanden, so wurden diese in flüssigem Stickstoff als Zellpellet schockgefrostet und sofort bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

Für die Extraktion wurde der Qiagen RNeasy Mini Kit verwendet. Waren die Proben nach der Lyse und Homogenisierung bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren worden, so wurden sie zunächst für mindestens 20 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert, um sie aufzutauen und



eventuell ausgefallene Salze wieder vollständig in Lösung zu bringen. Im Anschluss wurde gemäß der Anleitung des Herstellers verfahren. Es wurde zunächst 70%iges Ethanol zugefügt und die Lösung auf die Säulen mit Silica-Gel-Membran pipettiert. Nach Zentrifugation und einem Waschschrift (Puffer RW1) wurde eine DNA-Degradation auf der Säule mit dem Qiagen RNase free DNase Set gemäß der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Dafür wurde eine Lösung mit RNase-freier DNase direkt auf die Membran mit der gebundenen RNA pipettiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen (Puffer RW1, 2x Puffer RPE) konnte die RNA in RNase-freiem H<sub>2</sub>O eluiert werden. Die Lagerung der RNA-Lösungen erfolgte während laufender Arbeiten auf Eis; für eine längerfristige Lagerung wurden die Proben bei –80°C eingefroren.

### **3.1.2.3 Konzentrationsbestimmung**

#### **3.1.2.3.1 DNA**

##### *3.1.2.3.1.1 Fluorometrische Bestimmung*

Bei dieser Methode wird die zu messende DNA mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Hoechst 33258) versetzt, der mit der Doppelhelix der DNA interkaliert und nach Anregung durch UV-Licht in einer bestimmten Wellenlänge zu fluoreszieren beginnt (Emissions-Maximum: 461nm). Das Gerät misst die Fluoreszenzintensität, mittels der eine Aussage über die enthaltene DNA-Menge gemacht werden kann.

Für eine Messung wurde das Gerät zunächst mit einer DNA-Lösung mit definierter Konzentration (Kalbsthymus, 120ng/µl) kalibriert. Eine darauf folgende Probe-messung mit der gleichen DNA sollte einen Messwert ergeben, der maximal 10% von dem richtigen Wert abweicht. War dies der Fall, konnte mit der Messung der Proben begonnen werden. Wenn nicht, wurde die Kalibrierung so lange wiederholt, bis die Messung ein akzeptables Ergebnis erbrachte. Die Messungen erfolgten dabei immer nach dem gleichen Grundmuster: Nach dem Nullen des Gerätes mit 2ml Messlösung wurden 2µl der zu messenden DNA-Lösung zugefügt (= Verdünnung 1:1.000), kurz gevortext und dann gemessen. Der vom Gerät angezeigte Wert musste zur Berücksichtigung der Verdünnung mit 1.000 multipliziert werden.

##### *3.1.2.3.1.2 Konzentrationsbestimmung mittels Agarosegel*

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der DNA-Fragmente [s. Kap. 3.1.2.6.1] wurde die Quantifizierung mit Hilfe des Computerprogramms ‚BioImage Intelligent

Quantifizier' durchgeführt. Diese Software misst die Intensität verschiedener Banden und drückt sie in Zahlenwerten aus, die in gleicher Relation zueinander stehen wie die enthaltenen DNA-Mengen. Trägt man auf einer Spur ein DNA-Fragment bekannter Menge auf (z.B. einen Größenmarker, hier  $\phi$ X174 DNA-*Hae* III Digest), so kann man die anderen Banden durch den Vergleich mit einer Bande des Größenmarkers und Einsetzen der erhaltenen Zahlenwerte x (Marker) und y (Probe) in die Formel

$$\frac{\text{DNA-Menge in Marker-Bande}}{x} = \frac{\text{gesuchte DNA-Menge}}{y}$$

quantifizieren. Durch Auflösen der Gleichung kann die DNA-Konzentration ermittelt werden.

### 3.1.2.3.2 RNA

Zur Messung der RNA-Konzentration wurde ein Photometer verwendet. Das Photometer misst die Absorption der Lösung bei einer Wellenlänge von 260nm und berechnet daraus die Menge der enthaltenen RNA. Zunächst wurde das Gerät mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O genullt. Im Anschluss wurden die RNA-Proben im Verhältnis 1:50 in RNase-freiem H<sub>2</sub>O verdünnt, in einem Gesamtvolumen von 100 $\mu$ l in die Küvette pipettiert und die Lösung gemessen. Der ausgegebene Messwert musste zur Berücksichtigung der vorgenommenen Verdünnung mit 50 multipliziert werden.

### 3.1.2.4 **Synthese von cDNA**

Da die Taq-Polymerase nur DNA als Template erkennt, muss RNA vor ihrem Einsatz in einer PCR in cDNA umgeschrieben werden. Dabei synthetisiert eine Reverse Transkriptase einen komplementären DNA-Strang an die einzelsträngige RNA. Als Startpunkt dient dem Enzym ein der Reaktion ebenfalls zugefügtes Oligonukleotid, welches an die RNA bindet. Um spezifisch messenger-RNA umzuschreiben, werden Oligo dT-Primer eingesetzt, die ausschließlich an den PolyA-Schwanz der mRNA binden. Eine unspezifischere Reaktion erfolgt durch die Verwendung von Random Hexamer-Primern, die an nicht definierte Stellen aller RNA-Typen binden. Die Synthese erfolgt dann bis zur Bindungsstelle des nächsten Hexanukleotids am RNA-Strang, so dass eine Vielzahl von kürzeren Fragmenten entsteht.

Von jeder RNA-Probe wurde je ein Ansatz mit Oligo dT- sowie mit Random Hexamer-Primern angesetzt; um die Proben auf eine DNA-Kontamination hin zu

kontrollieren, wurde ein weiterer Ansatz mit Random Hexamer-Primern gemacht, dem aber keine Reverse Transkriptase zugefügt wurde. Es wurden 500ng oder 1µg frisch isolierter RNA in einem Reaktionsvolumen von 20µl eingesetzt. Die RNA wurde zusammen mit den Primern und RNase-freiem H<sub>2</sub>O in einem Gesamtvolumen von 13µl zunächst für 10 Minuten auf 65°C erhitzt und anschließend unverzüglich in Eis gekühlt, um eventuelle Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen. Nach kurzem Abzentrifugieren der Röhren wurden jedem Ansatz 4µl 5x First Strand Puffer sowie 2µl Dithiothreitol hinzugefügt. Die Proben, die mit Oligo dT-Primern umgeschrieben wurden, wurden nun für 2 Minuten bei 42°C inkubiert und anschließend 1µl der Reversen Transkriptase zugesetzt. Bei dem Einsatz von Random Hexamer-Primern wurden die Ansätze vor der 2-minütigen Inkubation bei 42°C und Zusatz des Enzyms 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer einstündigen Inkubation bei 42°C folgte die Inaktivierung des Enzyms durch eine Erhitzung auf 70°C für 15 bis 20 Minuten.

### 3.1.2.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Durch die Polymerase-Ketten-Reaktion können kleinste Mengen genetischen Materials vervielfältigt (amplifiziert) und dadurch angereichert werden. Die Spezifität der Amplifikation wird durch zwei sequenzspezifische Oligonukleotide (Primer) gewährleistet, die die Zielsequenz flankieren und die nach der Denaturierung der DNA an die ihnen komplementären Stränge binden. Im Anschluss wird der ‚fehlende‘ komplementäre Strang durch eine thermostabile DNA-Polymerase vervollständigt. Durch aufeinanderfolgende Zyklen der Denaturierung der DNA-Stränge, Anlagerung der Primer (Annealing) und DNA-Synthese (Elongation) wird eine exponentielle Vermehrung des gewünschten DNA-Fragmentes erreicht, da jeder neu gebildete Strang als Matrize für die Synthese eines weiteren Stranges genutzt werden kann. Am Ende der PCR enthält das Reaktionsgemisch nach  $n$  Zyklen für jede darin vorhandene Kopie der Zielsequenz ein theoretisches Maximum von  $2^n$  doppelsträngigen DNA-Molekülen.

Die PCR wurde in 25µl-Ansätzen in dünnwandigen Röhren (0,2ml) in einem Thermocycler (Perkin Elmer Gene Amp 2400 oder 9600 oder Biometra TGradient 96) durchgeführt. Dabei wurden zwischen 1ng und 150ng DNA eingesetzt. Eine Auflistung aller verwendeten Primer befindet sich im Anhang [s. Kap. 7.1, S. 132].

### 3.1.2.5.1 PCR mit spezifischen Primern

Folgendes Pipettierschema wurde angewendet:

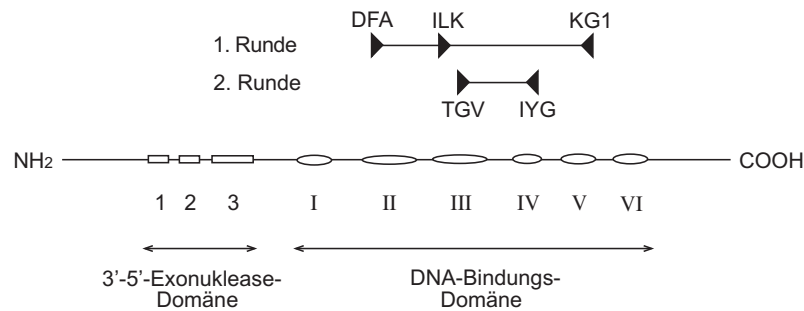
	<u>Volumen</u>	<u>Endkonzentration</u>
PCR-Puffer (10x)	2,5µl	1x
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2µl	2mM
DMSO	1,25µl	5%
dNTP (10mM) / dNTP + dUTP (12,5mM)	2µl	200µM/Nukleotid
Primer s (10µM)	2,5µl	1µM
Primer as (10µM)	2,5µl	1µM
AmpliTaq Gold Polymerase (5U/µl)	0,15µl	0,75U
Template	variabel	1-150ng
H <sub>2</sub> O	ad 25µl	

Der Aktivierung der DNA-Polymerase (95°C, 10 Minuten) folgten Denaturierung bei 95°C und Annealing bei der für die eingesetzten Primer idealen Temperatur (meist zwischen 50°C und 65°C) für je 30 Sekunden, sowie Elongation bei 72°C für eine von der Größe des zu amplifizierenden Fragmentes abhängigen Zeitdauer (20 sek – 3 min). Nach 40 bis 45 dieser Zyklen wurden die Proben zur finalen Strangverlängerung für 10 Minuten bei 72°C gehalten und anschließend auf 4°C gekühlt.

### 3.1.2.5.2 Consensus-PCR

Es wurde die von Ehlers *et al.* veröffentlichte Consensus-PCR [55] durchgeführt, die eine Modifikation der von VanDevanter *et al.* etablierten PCR [56] darstellt. Es handelt sich dabei um ein nested-PCR-System, bei dem degenerierte und inosinhaltige Primer an hochkonservierte Bereiche der herpesviralen DNA-Polymerase binden [s. Abb. 5]. Verbunden mit einer verhältnismäßig niedrigen Annealing-Temperatur (46°C) ist es den Primern dadurch möglich, nicht nur eine, sondern zahlreiche verschiedene Polymerase-Sequenzen zu erkennen. Durch den nested-Ansatz bleiben dennoch die nötige Spezifität und Sensitivität erhalten. Mit diesem PCR-Assay konnte bereits eine Vielzahl von Herpesviren amplifiziert werden, darunter auch eine große Zahl bis dahin nicht bekannter Viren [39, 53, 55, 56].

Alle Primer wurden in einer Endkonzentration von je 1µM eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen (MgCl<sub>2</sub>, dNTP, DMSO und 10x PCR-Puffer) entsprachen denen einer spezifischen PCR. Lediglich die Menge an DNA-Polymerase wurde auf 1U erhöht. Die Aktivierung der DNA-Polymerase erfolgte nach einem Time-Release-Protokoll;

**Abbildung 5 Schematische Darstellung der Primerlokalisierung bei der Consensus-PCR**

Die bei dieser PCR zur Verwendung kommenden Primer DFA, ILK, KG1, TGV und IYG sind durch schwarze Dreiecke, die erhaltenen Amplifikate durch schwarze Linien dargestellt. Die konservierten Bereiche der herpesviralen DNA-Polymerase sind durch Rechtecke (Exonuklease-Domäne) bzw. Ovale (DNA-Bindungs-Domäne) symbolisiert (modifiziert nach [57]).

dabei wird der Aktivierungsschritt bei 95°C auf 3 Minuten verkürzt, so dass nur ein Teil der gesamten Enzymmenge aktiviert wird. Die Aktivierung der restlichen Polymerase wird im Laufe der ersten Zyklen erreicht. Es folgten 55 Zyklen mit 30 Sekunden Denaturierung bei 95°C, 30 Sekunden Annealing bei 46°C und 45 Sekunden Elongation bei 72°C. Anschließend wurde die Temperatur für 10 Minuten zur endgültigen Strangverlängerung bei 72°C gehalten, bevor die Proben auf 4°C gekühlt wurden. 1µl des Amplifikates wurde in der zweiten Runde als Template verwendet. Bei ansonsten identischen Bedingungen wurden die Denaturierungs-, Annealing- und Elongationszeiten auf 20 Sekunden reduziert. Zur Sequenzierung der hierbei erhaltenen Produkte mussten die Amplifikate zunächst reamplifiziert werden, da die Sequenzergebnisse bei Verwendung der degenerierten Primer nicht immer zufrieden stellend sind. Diese Reamplifikation wurde mit den Primern P-85s/as durchgeführt, mit denen im Anschluss auch die Sequenzreaktion angesetzt wurde.

### 3.1.2.5.3 Modifizierte Consensus-PCR

Diese PCR wurde analog zu der nicht modifizierten Consensus-PCR durchgeführt. Die Modifikation bestand in der Veränderung zweier Primer, des KG1- sowie des TGV-Primers [s. Kap. 3.2.1.1]. Der KG1-Primer bestand aus einem Primergemisch von 6 oder 7 Primern, deren Konzentration im Ansatz jeweils 0,167µM (6 Primer) bzw. 0,143µM (7 Primer) betrug. Welche Primer zum Einsatz kamen, hing von dem Virusgehalt der untersuchten Proben ab: War dieser noch nicht untersucht, wurde in

der ersten Runde die Kombination KG1<sub>b,d-h</sub> eingesetzt; war die Probe negativ für PLHV-1 (56-mal), so war die Primerkombination KG1<sub>a,b,d-h</sub>, war sie negativ für PLHV-2 (27-mal), so kamen die Primer KG1<sub>b-h</sub> zum Einsatz. Grundsätzlich wurde in der zweiten Runde der modifizierte Primer TGV<sub>b</sub> eingesetzt.

#### 3.1.2.5.4 Long Distance-PCR

Diese PCR zur Erzeugung langer Amplifikate (> 2 kbp) wurde mit Hilfe verschiedener Kits (Takara Ex Taq oder Expand High Fidelity PCR System [2-4 kbp], Expand Long Template PCR Kit oder Takara LA [>4 kbp]) nach Anleitung der Hersteller mit geringen Modifikationen durchgeführt. Diese bestanden in einer etwas erhöhten Menge an dNTPs (Endkonzentration: je 400µM) und Primern (je 400nM). Pro Reaktion wurden 300-500ng DNA eingesetzt.

#### 3.1.2.5.5 RT-PCR

Nach der Extraktion der RNA aus den Zellproben [s. Kap. 3.1.2.2] und dem Umschreiben in cDNA [s. Kap. 3.1.2.4] wurde jeder Reaktionsansatz nach kurzem Abzentrifugieren 1:10 mit H<sub>2</sub>O verdünnt; von dieser verdünnten Lösung wurden in der PCR 10µl eingesetzt (= 1/20 des Reaktionsansatzes).

#### 3.1.2.5.6 Quantitative PCR (TaqMan-PCR)

Bei der TaqMan-PCR wird eine im Sequenzbereich zwischen den beiden Primern lokalisierte DNA-Sonde verwendet, die zwei Fluoreszenzfarbstoffe (Reporter und Quencher) trägt. Solange sich Reporter und Quencher in räumlicher Nähe zueinander befinden, die Sonde also intakt ist, wird die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes durch den Quencher unterdrückt. Sobald jedoch die Sonde an ihre Zielsequenz bindet, wird sie durch die Exonukleasefunktion der Taq-Polymerase abgebaut und damit Reporter und Quencher räumlich voneinander getrennt; der Reporter beginnt zu fluoreszieren. Je früher ein bestimmter Schwellenwert an Fluoreszenzintensität (Threshold) erreicht ist, umso mehr Ziel-DNA war im Ansatz vorhanden. Auf diese Weise und unter Verwendung einer Standardreihe kann eine quantitative Aussage über die im PCR-Ansatz vorhandene Menge an Ziel-DNA, z.B. Zahl der Viruskopien, gemacht werden [s. Abb. 6, S.39].

Neben den für PLHV-1, -2 und -3 sowie β-Aktin spezifischen Primern und Sonden, die gemeinsam mit Dr. Heinz Ellerbrok (PLHV) ausgewählt bzw. von der Firma TIB MOLBIOL, Berlin (β-Aktin) zur Verfügung gestellt wurden, wurde der TaqMan

Universal PCR Master Mix der Firma Applied Biosystems verwendet, allerdings nur in der halben der vom Hersteller empfohlenen Konzentration. Pro 25µl-Ansatz wurden demzufolge 6,25µl Mastermix verwendet. Die Primer wurden außer P-1156s (900nM) und P-468s (100nM) in einer Endkonzentration von 300nM eingesetzt. Die Endkonzentration der Sonden betrug 100nM. Die Menge der als Template eingesetzten DNA lag wie bei konventionellen PCRs zwischen 1ng und 150ng.

Die Proben wurden nach folgendem Protokoll in einem ABI PRISM 7700 Sequence Detector unter Verwendung der Software ‚Sequence Detector 1.6.3‘ gecycelt:

50°C	2 min	AMPerase-Reaktion	
95°C	10 min	Denaturierung	
95°C	20 sek	Denaturierung	] 40 - 45x
x°C	1 min	Annealing + Elongation	

Bei jedem Lauf wurde neben den zu untersuchenden Proben eine Verdünnungsreihe von Plasmiden mitgeführt, deren Insert die Zielregion der PCR beinhaltet. Unter Berücksichtigung der Plasmidgröße (Vektor + Insert) und der Konzentration der DNA-Lösung konnte mit Hilfe der Formel

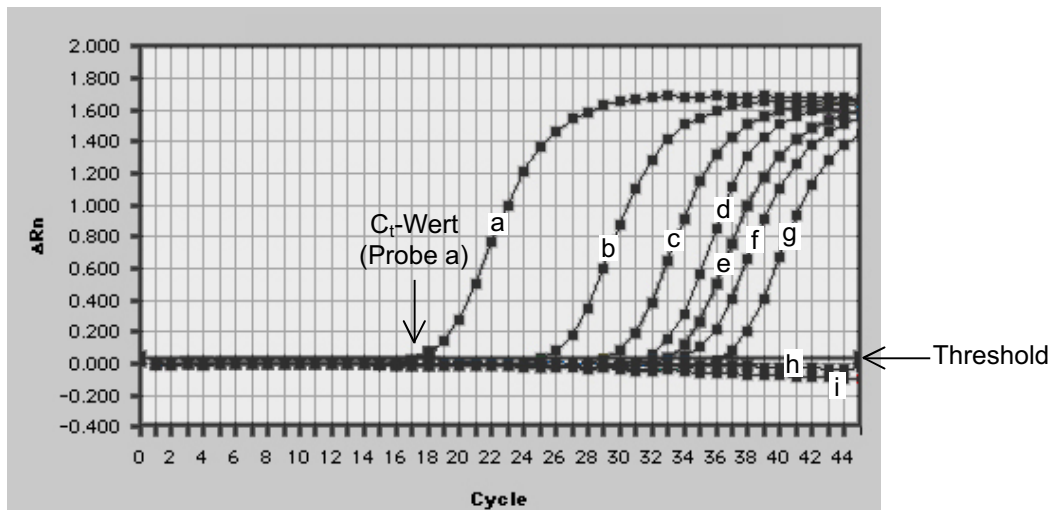
$$1\mu\text{g DNA (1.000 bp)} = 9,1 \times 10^{11} \text{ Moleküle}$$

die Menge an Plasmid-DNA berechnet werden, die einer Kopienzahl der Zielsequenz von  $10^6$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  und  $10^1$  entspricht, und diese in der PCR eingesetzt werden. Diese Plasmidproben wurden bei der Programmierung des Laufes als Standardreihe definiert, mit deren Hilfe die Kopienzahlen in den zu untersuchenden Proben bestimmt wurden. Zum Einsatz kamen die klonierten PCR-Produkte der Primerpaare P-778 (Probe #56a, PLHV-1), P-597 (Probe #546, PLHV-2) sowie P-1066 (Probe #1412, PLHV-3), deren korrekte Sequenz zuvor überprüft worden war.

Alle quantitativen PCRs wurden hinsichtlich ihrer Sensitivität getestet: Für alle drei PLHV-spezifischen PCRs konnte gezeigt werden, dass 20 Kopien sicher nachgewiesen werden können (6 von 6 Ansätzen in zwei unabhängigen PCRs; 45 Zyklen); 10 Kopien konnten in fünf von sechs Ansätzen detektiert werden. Mit der  $\beta$ -Aktin-PCR konnten 20pg genomische DNA nachgewiesen werden.

Eine Kreuzreaktion zwischen den verschiedenen Virus-PCRs konnte bei Verwendung der Plasmidverdünnungsreihen erst mit  $10^8$  Kopien bei Zyklus 39 beobachtet

Abbildung 6 Beispiel für das Ergebnis einer TaqMan-PCR



Exemplarisch ist das Ergebnis einer TaqMan-PCR dargestellt: Jeweils  $10^6$  (a),  $10^4$  (b),  $10^3$  (c),  $10^2$  (d),  $5 \times 10^1$  (e),  $2 \times 10^1$  (f),  $1 \times 10^1$  (g) und  $5 \times 10^0$  (h) Kopien des Plasmids mit der PLHV-1-Zielsequenz (P-778s/as) sowie eine Wasserkontrolle (i) wurden mit den Primern P-1125s/as untersucht; die Kurven stellen die gemessene Fluoreszenzintensität dar, die in Abhängigkeit von der Kopienzahl im PCR-Ansatz zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Zykluszahlen) einen Schwellenwert (Threshold) überschreitet. Diese als  $C_t$ -Werte bezeichneten Zykluszahlen werden vom Gerät ebenfalls angegeben.

werden; Kreuzreaktionen zu genomischer DNA wurden nicht erkennbar. Von einer ausreichend hohen Spezifität der quantitativen PCRs ist also auszugehen.

### 3.1.2.5.7 Auswertung der TaqMan-PCR-Daten

Mit jeder zu untersuchenden Probe wurden drei Ansätze gefahren. Von diesen drei Werten wurde für den  $C_t$ -Wert und damit auch für die vom Gerät ausgegebene Kopienzahl der Median ausgewählt, und alle weiteren Schritte in der Auswertung mit diesem Wert vorgenommen.

Zum direkten Vergleich verschiedener Proben auf DNA-Ebene war es notwendig, die durch die vorangehenden Schritte bedingten Schwankungen (Messfehler, Pipettierungenauigkeiten etc.) aus den erhaltenen Werten herauszurechnen und diese damit aufeinander abzugleichen. Dafür wurden alle miteinander zu vergleichenden Proben mit einer PCR untersucht, die ein zelluläres Gen nachweist ( $\beta$ -Aktin, P-468). Aus den erhaltenen  $C_t$ -Werten wurde der niedrigste ausgewählt (der Ansatz mit der größten Menge DNA / kleinsten Menge PCR-Inhibitoren), und die Differenz zwischen diesem niedrigsten Wert und den Werten aller anderen Proben bestimmt:

$$\Delta C_t = C_t(\text{Probe X}) - C_t(\text{min})$$



Der so für jede einzelne Probe erhaltene Differenzwert  $\Delta C_t$  wurde bei allen anderen mit diesen Proben durchgeführten quantitativen PCRs mit den dabei erhaltenen  $C_t$ -Werten verrechnet.

Auch die bei den verschiedenen quantitativen PCRs erhaltenen Kopienzahlen konnten mit Hilfe von  $\Delta C_t$  korrigiert werden: Es liegt dabei die theoretische Annahme zugrunde, dass mit jedem einzelnen Zyklus während der PCR die Zahl der enthaltenen Kopien / Amplifikate verdoppelt wird. Multipliziert man also die vom Gerät ausgegebene Kopienzahl jeder Probe mit  $2^{\Delta C_t}$ , so wird die unterschiedliche Amplifizierbarkeit der verschiedenen Proben berücksichtigt und man erhält die auf eine der Proben abgeglichenen Kopienzahlen.

Um verschiedene Proben auf RNA-Ebene miteinander vergleichen zu können, wurde neben den vom Gerät angegebenen Kopienzahlen auch das intrazelluläre Verhältnis von Virus- zu  $\beta$ -Aktin-Transkripten berücksichtigt. Dies war erforderlich, da die Qualität und Menge der cDNA der einzelnen Proben deutlich schwanken kann, bedingt vor allem durch die unterschiedliche Qualität der empfindlichen RNA, aber auch durch eine variable Effizienz der cDNA-Synthese. Um diese Schwankungen zu berücksichtigen, die einen erheblichen Einfluss auf die nachweisbaren Kopienzahlen haben, wurde für jede Probe neben der Virus-PCR auch eine PCR für das stabil transkribierte  $\beta$ -Aktin durchgeführt. Verrechnet man die beiden erhaltenen  $C_t$ -Werte zu einem ‚Differenzwert‘ ( $C_t$  [Virus-PCR] –  $C_t$  [ $\beta$ -Aktin-PCR]), so kann auf diese Weise eine Aussage über das Verhältnis dieser beiden Transkripttypen zueinander getroffen werden, die unabhängig von den detektierten Kopienzahlen ist. Eine Zu- oder Abnahme der viralen Replikation wird dadurch erkennbar.

Alle errechneten Kopienzahlen, pg-Angaben sowie die daraus abgeleiteten Zellzahlen, die in den Tabellen aufgelistet sind, wurden den gängigen mathematischen Regeln folgend gerundet.

### **3.1.2.6 Agarosegelelektrophorese**

#### **3.1.2.6.1 Standardgelelektrophorese**

Das Anlegen einer elektrischen Spannung an ein Agarosegel bewirkt eine Wanderung der negativ geladenen Nukleinsäuren in Richtung der Anode. Dabei ist die Diffusionsgeschwindigkeit umgekehrt proportional zu dem  $\log_{10}$  der Anzahl der Basenpaare. Die aufgetrennten Nukleinsäuren können mit Hilfe eines Fluoreszenz-

farbstoffs im UV-Licht visualisiert und dadurch im Gel lokalisiert werden. Zur Anwendung kam Ethidiumbromid, das die Nukleinsäuren in UV-Licht mit der Wellenlänge von 324-360nm sichtbar macht (Emission bei 590nm).

In Abhängigkeit von der erwarteten Fragmentgröße wurden 0,7-2%ige Agarosegele verwendet. Die durch Kochen in Laufpuffer gelöste Agarose wurde nach ihrer Abkühlung auf ca. 56°C in eine horizontale Gelkammer gegossen; durch Einsetzen eines Kamms in die noch flüssige Agarose bildeten sich nach dem Erkalten Geltaschen aus, in die nach dem Bedecken des Gels mit Laufpuffer die zu untersuchenden Proben pipettiert wurden. Diese waren zuvor mit 0,1 Volumen des zehnfach konzentrierten Probenpuffers gut durchmischt worden. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei konstanter Spannung von etwa 8V pro cm Elektrodendistanz.

#### 3.1.2.6.2 Gardella-Gel

Durch Lyse lebender Zellen auf einem Agarosegel wird die herpesvirale DNA freigesetzt und aufgrund des unterschiedlichen Laufverhaltens der möglichen Konformationen (linear / zirkulär) in der Agarose elektrophoretisch aufgetrennt [58].

Das Gel wurde in zwei Schritten gegossen. Nach Abdichtung der Gelkammer (Laufstrecke ca. 23cm) wurde zunächst das Trenngel (0,75% Agarose in 1x TBE) gegossen, wobei ein etwa 5cm breiter Streifen an der Kathode ausgespart wurde, in den im Anschluss das Lysisgel (0,8% Agarose + 2% SDS; nach Abkühlung auf 50°C Zugabe von 1mg/ml Pronase) gegossen und der Kamm eingetaucht wurde. Nach dem Überschichten des Gels mit Laufpuffer wurde es im Kühlraum (4°C) mit  $1-5 \times 10^6$  Zellen beladen, die in ca. 100µl Probenpuffer aufgenommen worden waren. Die in den Geltaschen befindliche Zellsuspension wurde mit etwa 50µl Lysispuffer überschichtet und das Gel anschließend gestartet. Nach etwa 4 Stunden bei 0,8V/cm wurde die Spannung für etwa 18 Stunden auf 4,5V/cm eingestellt. Anschließend wurde das Gel 3-mal für jeweils 30 Minuten in ca. 1 l Natriumphosphat-Puffer gewaschen, für 15 Minuten in 1x TBE gespült und die aufgetrennte DNA auf eine Nylonmembran transferiert (Vakuumblotter [s. Kap. 3.1.2.13.1]). Die nun auf der Membran befindliche DNA wurde im Crosslinker fixiert (1.200µJ) und anschließend über Nacht hybridisiert [s. Kap. 3.1.2.13.2]. Zum Einsatz kamen Sonden, die mit Digoxigenin markiert waren [s. Kap. 3.1.2.7.2]: Für den Nachweis von EBV dienten zwei markierte PCR-Produkte (aufgereinigte Virus-DNA; P-197s/as, P-1023s/as), für die Detektion von PLHV-3 zwei PCR-Produkte (kloniert; P-1066s/as, P-1472s/as) sowie zwei aufgereinigte und mittels Random Priming markierte nested PCR-

Produkte (P-920s/921as > P-920s/as; P-1606s/1571as > P-1642s/1570as). Die Bindung der Sonden wurde mittels Chemilumineszenz sichtbar gemacht.

### 3.1.2.7 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

#### 3.1.2.7.1 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind bakterieneigene Enzyme, welche fremde DNA, z.B. virale DNA, erkennen und abbauen können. Die Endonukleasen erkennen spezifisch eine Sequenz von vier bis acht Basen im DNA-Doppelstrang und schneiden beide Stränge der Duplex an jeweils einer Phosphodiesterbindung. Die eigene DNA wird dabei durch Methylierung der Erkennungssequenzen vor dem Abbau geschützt.

Für ihre spezifische Aktivität benötigen die verschiedenen Endonukleasen unterschiedliche Reaktionsbedingungen, welche durch Zugabe eines vom Hersteller mitgelieferten, zehnfach konzentrierten Puffers hergestellt werden.

Ein 10µl Restriktionsansatz enthielt folgende Komponenten:

1µg	DNA
1U	Enzym
1µl	Puffer (10x)
1µl	Bovines Serum Albumin (10x, entspricht 1mg/ml)
ad 10µl	H <sub>2</sub> O

Dabei ist 1U als diejenige Enzymmenge definiert, welche benötigt wird, um unter optimalen Reaktionsbedingungen in einer Stunde bei 37°C 1µg Substrat umzusetzen. Die Inkubation erfolgte für mindestens 2 Stunden bei der enzymespezifischen Temperatur (meist 37°C).

#### 3.1.2.7.2 Markierung von Nukleinsäuren

DNA-Fragmente wurden zur Herstellung von Sonden für den Southern Blot nicht-radioaktiv mit Digoxigenin markiert.

##### 3.1.2.7.2.1 Markierung in einer PCR-Reaktion

Es wurde dafür der ‚PCR DIG Probe Synthesis Kit‘ von Roche verwendet, bei dem dem Nukleotidmix zusätzlich DIG-markierte dUTPs zugefügt sind. Diese werden im Laufe der DNA-Synthese in die entstehenden Moleküle eingebaut und das Fragment dadurch markiert. Als Template wurde entweder ein kloniertes und auf seine richtige

Sequenz hin überprüfetes PCR-Produkt oder aber aufgereinigte Virus-DNA verwendet. Auf diese Weise konnte das Entstehen chromosomaler Nebenprodukte in der PCR ausgeschlossen und somit die Spezifität der Sonde sichergestellt werden. Das erhaltene Amplifikat wurde über eine Microspin S-400 HR-Säule gereinigt. Der Erfolg der Markierungsreaktion konnte durch eine Gelelektrophorese kontrolliert werden [s. Kap. 3.1.2.6.1], da die eingebauten DIG-Moleküle durch ihre Größe eine im Vergleich zum unmarkierten Fragment verlangsamte Laufgeschwindigkeit der Amplifikate bewirken. Das Ergebnis der Gelelektrophorese wurde gleichzeitig zur Quantifizierung der DNA-Fragmente genutzt [s. Kap. 3.1.2.3.1.2].

#### 3.1.2.7.2.2 Markierung über Random Priming

Bei einer Random Priming-Reaktion wird ebenfalls ein neuer DNA-Strang synthetisiert, in den DIG-markierte dUTPs eingebaut werden. Als Template wurde ein nested PCR-Produkt verwendet, das zuvor aus einem Agarosegel ausgeschnitten und aufgereinigt worden war [s. Kap. 3.1.2.8.1]. Dadurch war die höchstmögliche Sicherheit vor chromosomaler Kontamination des PCR-Produktes gegeben.

Das Prinzip der Random Priming-Reaktion beruht auf der Bindung von Hexanukleotiden mit randomisierter Sequenz an die zu markierenden DNA-Einzelstränge. Durch eine Polymerase (Klenow-Fragment) wird der fehlende Strang neu synthetisiert. Die Synthese bricht an der nächsten Hexanukleotid-Bindungsstelle ab, so dass eine Vielzahl von kürzeren Fragmenten entsteht.

Verwendet wurde der ‚DIG-High Prime‘-Kit von Roche gemäß der Anleitung des Herstellers. Die DNA wurde durch Kochen bei 100°C für 10 Minuten denaturiert, auf Eis abgekühlt und anschließend in der Reaktion eingesetzt. Nach etwa 20 Stunden Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 2µl EDTA (0,2M, pH 8,0) und Erhitzen auf 65°C (10 Minuten) beendet und anschließend die markierte DNA mit Hilfe der DIG Control Teststrips gemäß der Anleitung des Herstellers quantifiziert.

### 3.1.2.8 **Aufreinigung von Nukleinsäurefragmenten**

#### 3.1.2.8.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel

Zur Abtrennung von PCR-Nebenprodukten von dem gewünschten Fragment wurde die entsprechende Bande mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen oder des PerfectPrep Gel Cleanup Kits von Eppendorf (für große Fragmente) aus dem Gel isoliert. Die Aufreinigung der DNA-Fragmente basiert dabei auf der selek-

tiven Adsorption der DNA an eine Silica-Gel-Membran bzw. Glasfibrermembran in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen. Das zu isolierende Fragment wurde nach der Gelelektrophorese [s. Kap. 3.1.2.6.1] unter UV-Licht (354nm) ausgeschnitten, gewogen und gemäß der Anleitung des Kit-Herstellers bei 50°C in QG- bzw. Binding-Puffer gelöst. In einem Zentrifugationsschritt wurde die in der Lösung befindliche DNA an die Membran gebunden und im Anschluss mit ethanolhaltigen Puffern von anderen Bestandteilen befreit. Mit einem Elutionspuffer konnte die DNA letztendlich in ein frisches Eppendorf-Röhrchen überführt werden.

#### 3.1.2.8.2 Aufreinigung von DNA-Fragmenten über Säulen

Zur Abtrennung von Primern und freien Nukleotiden aus PCR-Ansätzen, z.B. für Sequenzierungen, wurden diese über eine Sephacryl-Säule gereinigt. In diesen Säulen ist das Sephacryl in TE-Puffer prääquiliert, welcher zunächst durch eine 1-minütige Zentrifugation bei 400xg entfernt wurde. Im Anschluss wurde der gesamte PCR-Ansatz auf die Säule appliziert und erneut für 2 Minuten zentrifugiert. Dabei werden alle kleinen Fragmente (Primer etc.) in der Säule zurückgehalten, und nur das große Fragment – also das PCR-Produkt – durchdringt das Sephacryl und kann in einem frischen Eppendorf-Gefäß aufgefangen werden.

#### 3.1.2.8.3 Alkoholfällung

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

Die zu fällende DNA wurde mit 10µl 3M Natriumacetat und H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 100µl eingestellt. Nach Zugabe von 250µl 100%igem Ethanols wurde gründlich gevortext und anschließend für mindestens 15 Minuten bei 20.000xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das DNA-Pellet mit 70%igem Ethanol überschichtet und erneut zentrifugiert. Wiederum wurde der Überstand abgenommen und das Pellet zur Trocknung für etwa 5 Minuten in einer Speed Vac zentrifugiert.

Überschritt das Volumen der zu fällenden DNA-Lösung 100µl, so wurden die Volumina der anderen Komponenten entsprechend angepasst.

#### 3.1.2.8.4 Aufreinigung der Sequenzreaktionen für die Analyse im Sequencer

Die Aufreinigung der Sequenzierungsansätze vor der Analyse im Sequencer ist zum Abtrennen von nicht eingebauten, fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden notwendig, die die Auswertung der Reaktion ansonsten behindern könnten.

Die Sequenzierungsreaktionen wurden mit zwei verschiedenen Geräten ausgewertet. Zu Beginn war dies der ABI PRISM 377 DNA Sequencer, für den die Proben einer Alkoholfällung unterzogen wurden [s. Kap. 3.1.2.8.3]. Zur besseren Sichtbarmachung des DNA-Pellets wurde dem Fällungsansatz 1µl Dextranblau-Lösung zugefügt. Nach Anschaffung des ABI PRISM 3100 Genetic Analyzers wurden die Ansätze nicht mehr selbst, sondern von S. Pociuli gereinigt, der auch die Sequencer-Läufe betreut hat. Dafür wurden Minisäulen mit Sephadex G-50 beladen, die Säulen nach dem Quellen mit 150µl H<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend die Sequenzreaktionen auf die Säulen geladen. Die Reaktionsprodukte wurden dann für 5 Minuten bei 910xg direkt auf eine 96-Loch-Reaktionsplatte zentrifugiert und in der SpeedVac-Zentrifuge getrocknet. Das Pellet wurde in 10µl Hi-Di Formamid aufgenommen und für 10 Minuten gelöst. Nach kräftigem Schütteln für eine Minute wurden die Proben abzentrifugiert und die Platte in den Sequencer gestellt.

#### 3.1.2.9 **Sequenzierung von Nukleinsäuren**

Die Sequenzierung von Nukleinsäuren, also die Bestimmung der spezifischen Nukleotidabfolge innerhalb eines DNA-Moleküls, wurde nach der Didesoxy-Methode durchgeführt [59]. Diese Methode basiert analog zur PCR auf der DNA-Neusynthese durch DNA-Polymerasen. Bei der Didesoxy-Methode werden zusätzlich zu den üblichen Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTP) so genannte Didesoxynucleosidtriphosphate (ddNTP) eingesetzt, denen eine Hydroxylgruppe am 3'-C-Atom des Zuckers fehlt. Dies hat zur Folge, dass keine Phosphorsäurediester-Bindung zwischen dem neu hinzukommenden und dem am Ende des wachsenden Stranges befindlichen Nukleotid mehr geknüpft werden kann, sofern es sich bei diesem um ein Didesoxynucleotid (ddNTP) handelt. Die Kettenverlängerung bricht an dieser Stelle ab (Kettenabbruch-Methode). Auf diese Weise entsteht eine Vielzahl von unterschiedlich großen DNA-Fragmenten. Maximal kann eine Länge von etwa 600-700 Basen erreicht werden. Durch die Markierung der vier ddNTP-Typen mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist es möglich, nach elektrophoretischer Auftrennung der Fragmente in einem denaturierenden Polyacrylamidgel die Sequenz in einem

Sequencer zu bestimmen. Durch den Argon-Laser werden die Fluoreszenzfarbstoffe angeregt, die daraufhin emittierten Farbsignale nach Fokussierung auf einem Hohlspiegel prismatisch aufgespalten und auf den Chip einer CCD (Charged Coupled Device)-Kamera verteilt. Mittels der ABI PRISM DNA Sequencing Analysis Software (Version 3.7) erfolgte die Auswertung und Übersetzung in die Nukleotidsequenz. Das Ergebnis der Sequenzierung wurde als Computerdatei gespeichert. Nach Aufreinigung [s. Kap. 3.1.2.8] und Quantifizierung [s. Kap. 3.1.2.3.1] der PCR-Produkte wurden ca. 50ng des Amplifikats in einer Reaktion eingesetzt, deren Gesamtvolumen von der Konzentration und damit dem benötigten Volumen der DNA-Lösung abhing. Durch die Zugabe nur eines Primers wurde jeweils nur ein Strang sequenziert. Der Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

1µl	Primer (10µM)
2-4µl	Premix (‚Big Dye‘)
xµl	DNA
ad 10 oder 20µl	H <sub>2</sub> O

Die Reaktion erfolgte unter nachstehenden Bedingungen in Thermocyclern:

95°C	2 min 30	
96°C	10 sek	] 25 x
x°C	5 sek	
60°C	4 min	

Die Annealing-Temperatur wurde dabei den verwendeten Primern angepasst.

### 3.1.2.10 Genome walking

Das Genome walking wurde von der Firma GenExpress GmbH (Berlin) wie von Ulrich *et al.* [40] beschrieben mit dem Universal GenomeWalker Kit (Clontech) durchgeführt. Mehrere sowohl PCR-viruspositive wie auch -negative DNA-Proben wurden dafür mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut und die Fragmente an Adapter ligiert. Im Anschluss konnten unter Verwendung eines Adapter-spezifischen und eines Virus-spezifischen Primers Amplifikate erzeugt werden, die geliefert und anschließend im eigenen Labor sequenziert wurden. Die PCR-virusnegativen DNA-

Proben dienten als Kontrolle zum Ausschluss eines Abgleitens in das Schweine-Genom.

### **3.1.2.11 Auswertung von Sequenzdaten**

Zunächst wurde mit dem Programm Factura der Bereich der Sequenz bestimmt, der definierte Qualitätskriterien (Lesbarkeit, Fehlerrate) erfüllte. Anschließend wurde dieser Bereich mit Hilfe des Programms AutoAssembler noch einmal überprüft und gegebenenfalls korrigiert (Verlängerung / Verkürzung des lesbaren Bereiches, Abschneiden von Primersequenzen etc.). Auch wurde die Sequenz auf eventuelle Fehler überprüft. Die auf diese Weise bearbeiteten Sequenzen wurden anhand sich überlappender Sequenzabschnitte in einem Assembly zusammengefügt. In diese Assemblies wurden weitere Sequenzdateien eingefügt, bis die Sequenz die gewünschte Länge, Genauigkeit und Redundanz hatte. Jedes Nukleotid musste mit mindestens vier unzweifelhaften Sequenzen, davon mindestens eine auch auf dem Gegenstrang, bestimmt worden sein. Wenn die Sequenz die angelegten Maßstäbe erfüllte, wurde eine Consensus-Sequenz errechnet und diese als MacVector-Datei gespeichert. Die so gespeicherten Dateien konnten dann weiter ausgewertet und mit anderen Sequenzen verglichen werden.

BLAST-Analysen wurden mit der NCBI-Datenbank (National Center for Biotechnology Information) durchgeführt. Für Phylogenetische Analysen kamen die Programme Se-AL v1.0a1 Fat, SeqPup/68K, Protdist, Neighbor, Seqboot sowie Treeview des PHYLIP Programmpaketes zur Anwendung [60]; sie wurden aus Teilausschnitten der Aminosäuresequenz der DNA-Polymerase berechnet (430 aa). Die Homologie-Werte wurden ebenfalls auf Aminosäure-Ebene mit dem Programm GAP aus dem GCG-Programmpaket am Server des Deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg errechnet (gap creation penalty = 8, gap extension penalty = 2).

### **3.1.2.12 Klonierung von PCR-Fragmenten**

Die klonale Amplifikation von DNA-Fragmenten, die durch Ligation in geeignete Plasmid-Vektoren eingeschleust werden, erfolgt über die Transformation kompetenter Wirtsbakterien, aus denen die DNA dann wieder isoliert wird. Zur Verwendung kam der TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen). Der Kit macht sich den Umstand zunutze, dass Taq-Polymerasen an das 3'-Ende des neu entstandenen Stranges zusätzlich ein einzelnes Adenosin synthetisieren. Der mit dem Kit gelieferte



linearisierte Vektor (pCR2.1) hat an beiden Enden ein überhängendes Thymidin. Eine Topoisomerase I katalysiert die dadurch mögliche Ligationsreaktion. Diese wurde gemäß der Anleitung des Herstellers mit einem frisch hergestellten Amplifikat durchgeführt.

Die multiple Klonierungsstelle (multiple cloning site, MCS) des Vektors befindet sich innerhalb eines *lacZ*-Gens (N-terminales  $\alpha$ -Fragment der  $\beta$ -Galactosidase); dieses allein besitzt keine  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität, sondern benötigt dafür das in den Bakterienzellen befindliche, ebenfalls inaktive C-terminale  $\omega$ -Fragment ( $\alpha$ -Komplementation). Bakterienkolonien, in denen das *lacZ*-Gen durch die Insertion zerstört ist, bleiben nach der Inkubation auf X-Gal-haltigen Nährböden weiß; Klone ohne Insertion dagegen exprimieren das  $\alpha$ -Fragment und färben sich durch das Umsetzen des Substrates blau. Dadurch ist eine einfache Selektion der gewünschten Klone möglich, die so genannte Blau-Weiß-Selektion.

Für die Transformation kompetenter Bakterienzellen (TOP 10 One Shot E.coli) wurde ein Aliquot der Ligationsreaktion verwendet. Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 2  $\mu$ l des Ligationsansatzes vorsichtig vermengt. Nach einer Inkubation auf Eis folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 30 Sekunden. Die Zellen wurden sofort wieder auf Eis transferiert und in zimmerwarmem SOC-Medium aufgenommen. Es folgte eine einstündige Inkubation bei 37°C auf einem Schüttler. 50 bzw. 150  $\mu$ l der Zellsuspension wurden dann auf Selektionsmedium ausplattiert (LB-Medium + 100  $\mu$ g/ml Ampicillin, auf dem 40  $\mu$ l X-Gal-Lösung ausgestrichen worden waren) und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurden etwa 10 weiße oder hellblaue Kolonien gepickt und in ca. 4ml ampicillinhaltiges Flüssigmedium (LB-Medium + 100  $\mu$ g/ml Ampicillin) aufgenommen. Diese Flüssigkulturen wurden wiederum über Nacht, maximal aber für 16 Stunden, auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert. Aus einem Aliquot dieser Flüssigkulturen wurden am folgenden Morgen die Plasmide isoliert [s. Kap. 3.1.2.1.4] und die dabei erhaltene DNA einem Restriktionsverdau mit *EcoRI* [s. Kap. 3.1.2.7.1] unterworfen. Der verwendete Vektor besitzt beiderseits direkt neben der multiple cloning site eine Schnittstelle für dieses Enzym, wodurch das Insert wieder aus dem Vektor herausgeschnitten werden kann. Trennt man die geschnittenen Plasmide durch eine Gelelektrophorese [s. Kap. 3.1.2.6.1] auf, so ist es möglich, die Größe des Inserts zu beurteilen und anhand dessen einige – mutmaßlich richtige – Klone auszuwählen. Die Inserts der ausgewählten Klone wurden im Anschluss sequenziert [s. Kap. 3.1.2.9].

### 3.1.2.13 Hybridisierung von Nukleinsäuren (Southern Blot)

#### 3.1.2.13.1 Southern Blot Transfer

Die in einer Gelelektrophorese aufgetrennten DNA-Fragmente wurden mit Hilfe einer Vakuum-Blotkammer auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert. Dazu wurde das Gel luftblasenfrei auf die Membran gelegt und die restliche Fläche der Blotkammer mit einer Maske und Parafilm gegen das Vakuum abgedichtet. Im Anschluss wurde das Vakuum angelegt, welches zunächst zum endgültigen Abdichten der Apparatur bei 80-100mbar eingestellt wurde. Sobald der Vakuumblotter keine Nebenluft mehr zog, wurde das Vakuum auf etwa 50mbar heruntergeregelt und das Gel mit Denaturierungspuffer bedeckt. Nach etwa 20-minütiger Inkubation wurde der überschüssige Puffer entfernt und Transferpuffer auf das Gel pipettiert. Nach einer Inkubation von etwa 60 Minuten befand sich nun die DNA auf der Membran. Bei großen DNA-Fragmenten (>10 kbp, Gardella-Gel) wurde die DNA vor der Denaturierung durch eine Depurinierung mit 0,25N Salzsäure bis zum Farbumschlag des Bromphenolblaus fragmentiert. Nach dem Entfernen der Purinbasen durch die Säure werden durch den hohen pH des Denaturierungspuffers an diesen Stellen Strangbrüche in das Phosphodiester-Gerüst des DNA-Stranges eingefügt. Dadurch wird der Transfer der großen DNA-Moleküle wesentlich verbessert.

Die Membran wurde nach Abschluss des Transfers mit der DNA-Seite nach oben auf ein mit Ammoniumacetat-Lösung angefeuchtetes Stück Whatman-Papier gelegt und die DNA durch UV-Bestrahlung in einem Crosslinker (1.200µJ) an der Membran fixiert. Die Membran wurde unverzüglich hybridisiert.

#### 3.1.2.13.2 Hybridisierung der Filter

Die Hybridisierung von DNA auf Nylonmembranen erfolgte bei 37°C oder 42°C in einem sich drehenden Glasrohr oder Greiner-Röhrchen in einem Hybridisierungs-ofen. Die Hybridisierungstemperatur lag somit etwa 25°C unterhalb des Schmelzpunktes der DNA-Hybride, der nach folgender Formel berechnet wurde:

$$T_m = 81,5 + 16,6 \times \log(\text{Molarität der monovalenten Salze}) + 0,41 \times \% \text{ GC} \\ - 0,72 \times \% \text{ Formamid}$$

Die Nylonmembran wurde zur Reduktion von Hintergrundsignalen für mindestens eine Stunde bei der auch für die Hybridisierung vorgesehenen Temperatur in

Hybridisierungslösung ohne Sonde vorinkubiert (ca. 10ml pro 100cm<sup>2</sup> Membranfläche). In dieser Zeit wurde die Sonde durch 10-minütiges Kochen bei 100°C denaturiert und im Anschluss sofort auf Eis transferiert. Nach der Prähybridisierung wurde die gebrauchte Lösung entfernt und durch frische Hybridisierungslösung ersetzt (5-10ml pro 100cm<sup>2</sup> Membranfläche), welcher zuvor die Sonde zugesetzt worden war (20-50ng/ml Hybridisierungslösung, bei Chemilumineszenz-Visualisierung 10-20ng/ml). Es wurde über Nacht bei 37°C oder 42°C inkubiert.

Am folgenden Morgen wurde der Blot zunächst von unspezifisch gebundener Sonde durch jeweils zweimaliges Waschen in 2 x SSC/0,1% SDS (5 min, Raumtemperatur) sowie 0,1 x SSC/0,1% SDS (20 min, 60°C oder 68°C) befreit. Die Temperatur in den stringenten Waschschritten richtete sich ebenfalls nach dem Schmelzpunkt der DNA-Hybride. Die Membran wurde anschließend mit dem ‚DIG Wash and Block Buffer Set‘ nach Anleitung des Herstellers gewaschen, geblockt und in der Antikörper-Lösung inkubiert (anti-DIG-AP, 1:20.000). Überschüssiger Antikörper wurde durch erneutes Waschen entfernt und die Antikörperbindung durch Inkubation mit einer Substratlösung visualisiert. Zur Detektion der Hybride mittels einer Chemilumineszenz-Reaktion wurde CDP-Star gemäß der Herstelleranweisung verwendet und die Reaktion anschließend durch Belichtung eines Röntgenfilms sichtbar gemacht.

### 3.1.2.13.3 Denaturierung von Kalbsthymus-DNA

Zur Blockierung unspezifischer DNA-Bindungsstellen bei einem Southern Blot wurde der Hybridisierungslösung denaturierte Kalbsthymus-DNA zugesetzt.

100mg der lyophilisierten DNA wurden zunächst in 5ml TE-Puffer (pH 8,0) bei 80°C gelöst. Anschließend wurde die DNA mit einem Ultraschallgerät denaturiert, bis die ursprünglich dickflüssige, während der Behandlung auf Eis gelagerte Lösung einen eher dünnflüssigen Charakter angenommen hatte. Langsam und unter vorsichtigem Schütteln wurden dann 5ml einer 1N NaOH-Lösung zugegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 10ml einer Mischung aus gleichen Anteilen 1N HCl und 1M Tris-HCl (pH 7,4) wurden tropfenweise zur Neutralisierung der Lösung zugegeben. Die Endkonzentration der DNA-Lösung betrug somit 5mg/ml.

### 3.1.2.14 Zellkultur

#### 3.1.2.14.1 Kultivierung von Zellen

Die Anzucht von Zellen erfolgte in Einweg-Plastikkulturgefäßen unterschiedlicher Größe bei 37°C in einer 5% CO<sub>2</sub> enthaltenden Atmosphäre. Verwendetes FKS ist vor dem Einsatz durch eine Inkubation bei 56°C für eine Stunde hitzeinaktiviert worden.

##### 3.1.2.14.1.1 Adhärent wachsende Zellen

Die adhärent wachsenden Zelllinien wurden in D-MEM kultiviert. Der FKS-Anteil betrug in Abhängigkeit von der Zelllinie 5% (ST, PK-15, POEK, WSH, MDBK, Vero) oder 10% (293, SE-R). Sobald der Zellrasen geschlossen war, wurden die Zellen umgesetzt. Dafür wurde zunächst das Medium vollständig abgenommen und der gesamte Zellrasen mit Trypsin-Lösung benetzt. Überflüssiges Trypsin wurde wieder entfernt. Nach einer Inkubation bei 37°C für ca. 5-10 Minuten konnten die sich vom Flaschenboden ablösenden Zellen in 5-10ml Medium aufgenommen und durch mehrfaches Auf- und Abziehen in einer Glaspipette separiert werden. Ein Teil der so entstandenen Zellsuspension wurde in eine neue Kulturflasche überführt und diese mit frischem Medium aufgefüllt. Die Zellen wurden je nach Wachstumsgeschwindigkeit im Verhältnis 1:3 bis 1:20 verdünnt.

##### 3.1.2.14.1.2 Suspensionszellen

Die porcinen B-Zelllinien L23 und L52, die Krallenaffen-B-Zelllinie B95-8, die humane T-Zelllinie Molt 4/8 sowie auch die primären Lymphozyten wachsen als Suspensionskulturen. Die Zellen wurden in RPMI 1640 gehalten, das mit 10% FKS sowie 2mM Glutamin supplementiert war. Das Medium für L23 und L52 enthielt zusätzlich 1mM Natrium-Pyruvat und 0,05mM  $\beta$ -Mercaptoethanol.

Die primären PBMC wurden nach ihrer Isolierung mittels eines Ficoll-Gradienten [s. Kap. 3.1.2.14.3] in einer Zelldichte von  $2 \times 10^6$  Zellen pro ml in Medium aufgenommen und in der Regel nur für wenige Tage in Kultur gehalten. Sollten sie länger gehalten werden, so wurde regelmäßig ein Teil des Mediums durch frisches Medium ersetzt.

Die Zelllinien L23 und L52, B95-8 und Molt 4/8 wurden in einer Zelldichte von maximal  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml Medium gehalten. Zum Verdünnen der Zellen wurden sie zunächst aufgeschüttelt, etwa 4/5 der Zellsuspension der Flasche entnommen und ein entsprechendes Volumen frischen Mediums zugesetzt.

### 3.1.2.14.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur längerfristigen Lagerung von Zellen wurde zunächst eine Zellsuspension (d.h. bei adhärennten Zellen nach dem Trypsinieren und Vereinzeln) in einem Plastikröhrchen zentrifugiert (150xg, 10 Minuten). Das Zellpellet wurde in Einfriermedium I (adhärente Zellen) oder Einfriermedium II (Suspensionszellen) resuspendiert, wobei die Zelldichte etwa  $1 \times 10^7$ /ml betragen sollte. Die Lösung wurde in 1ml-Aliquots aufgeteilt, die zunächst für 1 Stunde bei 4°C gekühlt und im Anschluss dick mit Zellstoff umwickelt über Nacht bei -80°C langsam eingefroren wurden. Durch Überführung in flüssigen Stickstoff konnten die Zellen dauerhaft gelagert werden.

Zur erneuten Kultivierung von adhärennten Zellen wurde ein Aliquot bei 37°C aufgetaut und in etwa 10 ml Medium überführt. Nach einer Zentrifugation bei 150xg für 5 Minuten wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 2-3ml frischen Mediums resuspendiert. Die so erhaltene Suspension wurde in 10ml Medium aufgenommen und in eine Kulturflasche mit einer Grundfläche von 25cm<sup>2</sup> überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und die Zellen bis zum Schluss des Zellrasens kultiviert, bevor sie umgesetzt wurden.

Suspensionszellen wurden wieder in Kultur genommen, indem ein Aliquot nach dem Auftauen bei 37°C in ca. 20-30ml Medium aufgenommen und bis zum Erreichen der zum Verdünnen nötigen Zellzahl kultiviert wurde.

### 3.1.2.14.3 Isolierung von porcinen peripheren mononukleären Zellen des Blutes

Um primäre mononukleäre Blutzellen (PBMC) zu isolieren, wurde Ficoll-Pacque oder Ficoll-Pacque Plus verwendet. Die Konzentration des Ficolls – eines synthetischen nicht-ionischen Sucrose-Polymers – ist so eingestellt, dass die Lösung eine definierte Dichte aufweist; wird die Ficoll-Lösung mit Frischblut überschichtet und anschließend zentrifugiert, so zeigen die einzelnen Zelltypen ein unterschiedliches Verhalten: Erythrozyten und Granulozyten werden sedimentiert, während die mononukleären Zellen sich an der Interphase zwischen Ficoll-Lösung und Plasma anreichern. Von dort können sie abgenommen und weiter aufgereinigt werden.

Um Zellen mit hoher Viabilität zu erhalten, wurde das Blut so frisch wie möglich verarbeitet. Auf anfallenden Transportwegen wurde es warm gehalten, um ein Aggregieren der Thrombozyten zu verhindern. Zur Isolierung der Zellen wurde das Blut zunächst 1:1 mit PBS verdünnt. Etwa 15ml zimmerwarme Ficoll Pacque-Lösung wurden in Plastikröhrchen (50ml) vorgelegt und mit etwa 30ml des verdünnten Blutes

überschichtet. Dabei war darauf zu achten, dass sich das Blut nicht mit der Ficoll-Lösung durchmischt. Nach einer 30-minütigen Zentrifugation bei 400xg konnten dann die zwischen Ficoll und Plasma befindlichen Zellen mithilfe einer gestopften Pasteurpipette abgenommen und in ein frisches Röhrchen überführt werden. Das Röhrchen wurde mit PBS/FKS aufgefüllt und erneut zentrifugiert (100xg). War nach diesem ersten Waschschrift noch eine größere Menge kontaminierender Erythrozyten in dem Zellpellet erkennbar, so wurde nach Entfernung des Überstandes das Zellpellet in RCLB aufgenommen und zur osmotischen Lyse der Erythrozyten für 10 bis 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach Auffüllen mit PBS/FKS und einer erneuten Zentrifugation konnte der Erfolg der Erythrozyten-Lyse beurteilt werden. War er ausreichend, so wurde noch zweimal mit PBS/FKS gewaschen; war er es nicht, so ging den weiteren Waschschriften ein erneuter Lyse-Schritt voraus. Die gewaschenen Zellen wurden in FKS- und Antibiotika-supplementiertem RPMI 1640 aufgenommen und gezählt [s. Kap. 3.1.2.14.4].

#### 3.1.2.14.4 Zellzählung

Sollte die Lebendzahl der Zellen bestimmt werden, so wurde das Trypanblau-Verfahren angewendet. Trypanblau ist ein Farbstoff, der die Zellmembran toter Zellen leicht durchdringt, die lebender Zellen aber nicht. Suspendiert man Zellen in einer Trypanblau-Lösung, so erscheinen lebende Zellen im Mikroskop leuchtend weiß, während tote Zellen tiefblau sind.

10µl der Zellsuspension wurden in 190µl der Trypanblau-Lösung aufgenommen und für etwa 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Gemisch wurde dann auf eine Neubauer-Zählkammer appliziert. Gezählt wurden nur strahlend weiße Zellen; auch leicht lila verfärbte Zellen wurden als tot gewertet. Nach Auszählung aller acht großen Eckquadrate wurde das Ergebnis durch acht geteilt, um einen Mittelwert für die Zellzahl in den Eckquadraten zu erhalten. Durch Multiplikation dieses Mittelwertes (= n) mit dem Verdünnungsfaktor kann unter Berücksichtigung der Kammergröße die Zellzahl pro Milliliter der Zellsuspension errechnet werden.

$$\text{Zellzahl/ml} = n \times 20 \text{ (Verdünnungsfaktor)} \times 10^4 \text{ (Kammergröße)}$$

Zur Ermittlung der Gesamtzellzahl wurde die Zellzahl pro Milliliter mit dem Gesamtvolumen der Zellsuspension multipliziert.

### 3.1.2.14.5 Kokultivierung

Bei einer Kokultivierung werden mindestens zwei verschiedene Zelltypen in einer Kulturschale zusammen kultiviert. Aus dem gemeinsamen Halten von (latent infizierten) primären Zellen, z.B. PBMC, mit einer suszeptiblen adhären Zellellinie gelingt so häufig die Anzucht von Herpesviren. Die Stimulation der Zellen durch die für primäre Zellen stressreichen Kulturbedingungen führt zu einer Reaktivierung der Viren und damit zu einer Infektion der adhären Zellen. Unterstützt werden kann die Reaktivierung durch die Supplementierung des Mediums mit einem geeigneten Stimulans. Diese Technik sollte zur Anzucht der porcinen Gammaherpesviren herangezogen werden.

Etwa  $5 \times 10^5$  der adhären Zellen wurden in Sechslachplatten ausgesät und für 1 bis 2 Stunden bis zum Absetzen der Zellen auf dem Boden im Brutschrank belassen. In dieser Zeit wurden PBMC aus Frischblut isoliert [s. Kap. 3.1.2.14.3] und anschließend in gleicher Zahl den adhären Zellen zugesetzt. Die PBMC wurden bis zum ersten Umsetzen der adhären Zellen in der Kulturschale belassen und erst dabei entfernt. Die Kulturen wurden täglich auf das Auftreten eines CpE untersucht. Bei jedem Umsetzen wurden Aliquots der Zellen abgenommen, aus denen im Anschluss die DNA extrahiert [s. Kap. 3.1.2.1.2] und mittels PCR auf ihren Virusgehalt [s. Kap. 3.1.2.5] untersucht wurde.

### 3.1.2.14.6 Stimulation von Suspensionszellen

Latent in primären PBMC oder der porcinen B-Zellellinie L23 vorliegendes Virus sollte durch Stimulation mit verschiedenen Chemikalien reaktiviert und dadurch in den Überstand gebracht werden. Dafür wurden die Zellen in einer Dichte von  $2 \times 10^6$ /ml in 15ml (primäre Zellen) oder  $2 \times 10^5$ /ml in 50ml (L23) frischen Mediums aufgenommen und unmittelbar darauf dem Medium verschiedene Substanzen oder Substanzkombinationen zugesetzt. Nach einigen Tagen wurde zur Ernte von Zellen und Überständen der gesamte Inhalt der Kulturflasche nach Aufschütteln der Zellen in ein Plastikröhrchen überführt und dieses für 10 Minuten bei 150xg zentrifugiert. Eventuell noch in der Flasche befindliche adhären lebende Zellen (Monozyten / Makrophagen) wurden durch Trypsinieren vom Boden gelöst und dem bei der Zentrifugation entstandenen Zellpellet nach Abnahme des Überstandes zugefügt. Das Zellpellet wurde resuspendiert und je nach Größe in 2 bis 4 Portionen aufgeteilt. Diese wurden wiederum für 10 Minuten in Eppendorfgläsern bei 300xg zentrifugiert, der Überstand

verworfen und die Zellpellets für DNA- und / oder RNA-Präparation vorbereitet [s. Kap. 3.1.2.1.2 und Kap. 3.1.2.2]. Die Überstände wurden wie in Kapitel 3.1.2.15.1 beschrieben für die Ultrazentrifugation vorbereitet.

### **3.1.2.15 Pelletieren von Virus aus Zellkulturüberständen**

Für die Ultrazentrifugation wurden die Zellkulturüberstände zunächst in zwei Schritten vorzentrifugiert, um Zellen und Zelltrümmer zu pelletieren. Dafür wurden sie für jeweils 30 Minuten bei 1.000 rpm (200xg) und 4.000 rpm (3.500xg) zentrifugiert. Im Anschluss wurden sie entweder sofort weiterverarbeitet, über Nacht bei 4°C oder bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert. Wurden sie nicht unverzüglich weiter bearbeitet, so wurde vor der Ultrazentrifugation zunächst wiederum für 30 Minuten bei 3.500xg zentrifugiert.

#### **3.1.2.15.1 Ultrazentrifugation zur anschließenden Extraktion der enthaltenen DNA**

Für die Untersuchung der DNA wurden die vorzentrifugierten Überstände entweder in einem SW41 Ti- oder einem SW28-Rotor ultrazentrifugiert. Entweder 10ml (SW41 Ti) oder 30ml (SW28) des Überstandes wurden in den entsprechenden Plastikröhrchen vorgelegt und mit ca. 3ml (SW41 Ti) bzw. ca. 7ml (SW28) 30%iger Sucrose-Lösung unterschichtet. Die Röhrchen wurden austariert und anschließend bei 25.000 rpm und 15°C für 120 Minuten (SW41 Ti) bzw. 90 Minuten (SW28) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Röhrchen vorsichtig entleert und über Kopf getrocknet. In den ersten Versuchen wurde das Viruspellet in Resuspensionspuffer I aufgenommen und für 1 Stunde bei 37°C in einem Rotator inkubiert. Anschließend wurde mit 30U DNase I für eine weitere Stunde inkubiert und die enthaltene DNA nach Inaktivierung des Enzyms bei 70°C für 20 Minuten mit dem Qiagen DNeasy Tissue Kit unter Zugabe von 2µg Kalbsthymus-DNA als Träger extrahiert (Protokoll 1a). Bei einem Versuch wurde statt des DNeasy Tissue Kits der QIAamp Ultrasens Virus Kit verwendet (Protokoll 1b). Nach Optimierung des Zentrifugationsprotokolls wurde folgendermaßen verfahren (Protokoll 2): Das Pellet wurde in Resuspensionspuffer II aufgenommen und nach einer einstündigen Inkubation 100U DNase I zugegeben. Die Suspension wurde für zwei Stunden auf einem Rotator inkubiert, und anschließend das Enzym bei 70°C in 20 Minuten inaktiviert. Letztlich konnte die DNA unter Verwendung des QIAamp Ultrasens Virus Kit extrahiert werden [s. Kap. 3.1.2.1.3]. Mit diesem Protokoll konnte bei Zusatz von



10µg genomischer DNA in den Resuspensionspuffer nach der DNA-Extraktion in einer  $\beta$ -Aktin-spezifischen PCR kein Signal mehr erzielt werden. Ein Test mit einem BoHV-1-haltigen Überstand verlief aber nach wie vor positiv: In einer Verdünnungsreihe, die gemäß dem neuen Protokoll bearbeitet wurde, konnten 10pfu/ml problemlos in einer Einzelrunden-PCR mit BoHV-1-spezifischen Primern nachgewiesen werden.

#### 3.1.2.15.2 Ultrazentrifugation für eine Gardella-Gel-Analyse

Hierfür wurden 36ml der vorzentrifugierten Überstände ohne Sucrosekissen in einem SW28-Rotor für 90 Minuten bei 25.000 rpm und 15°C zentrifugiert. Nach Ende des Zentrifugenlaufes wurden die Röhrchen vorsichtig ausgekippt und die Pellets kurz über Kopf getrocknet. Im Anschluss konnte das Pellet in Gardella-Gel-Probenpuffer aufgenommen und auf das Gel aufgetragen werden.

#### 3.1.2.16 **Sortierung von Zellen mittels Magnetic Beads (MACS)**

Zur Sortierung der drei großen Subpopulationen der Peripheren Mononukleären Blutzellen (PBMC) – B-, T- und myeloiden Zellen – wurden Microbeads der Firma Miltenyi Biotec verwendet. Es handelt sich dabei um superparamagnetische Partikel aus Eisenoxid mit einem Durchmesser von etwa 50nm. Sie sind mit Polysacchariden beschichtet, an die wiederum Antikörper konjugiert sind. Durch Bindung dieser Antikörper an auf der Zelloberfläche befindliche Antigene wird die Zelle mit den Microbeads markiert. Appliziert man die Mischung aus markierten und nicht markierten Zellen auf eine Säule mit einer ferromagnetischen Matrix und setzt diese wiederum einem magnetischen Feld aus, so werden die markierten Zellen im Gegensatz zu den nicht markierten in der Säule festgehalten. Die nicht markierten Zellen können weggespült und die markierten Zellen im Anschluss nach Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld eluiert werden. Auf diese Weise werden die gewünschten Zellen selektiert und damit aufkonzentriert. Da Microbeads mit Antikörpern, die gegen porcine Antigene gerichtet sind, nicht hergestellt werden, musste auf die indirekte Markierung der Zellen ausgewichen werden. Dabei werden die Zellen zunächst mit einem aus der Maus stammenden antigenspezifischen Antikörper inkubiert; erst in einem zweiten Schritt werden die Microbeads eingesetzt, an die ein gegen IgG der Maus gerichteter, in der Ziege generierter Antikörper konjugiert ist.

Die aus Frischblut isolierten und in PBS/EDTA aufgenommenen PBMC wurden gezählt [s. Kap. 3.1.2.14.4] und nach Abnahme der Kontrollzellen (PCR-Kontrollen und Durchflusszytometrie, s. Kap. 3.1.2.17) gedrittelt. Zum Einsatz kamen somit pro Sortierungsansatz je nach Zellausbeute bei der Isolierung  $5 \times 10^7$  bis  $5 \times 10^8$  Zellen. Diese wurden zur Vermeidung unspezifischer Bindungen mit 300ng Ziegen-Gammaglobulin für 30 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$  geblockt. Diese Inkubation wurde wie alle folgenden auf einem Rotator vorgenommen. Es folgte die Zugabe der Primärantikörper (anti-Immunglobulin [1:10 verdünnt], anti-CD3 [ $0,1 \mu\text{g}/10^6$  Zellen] oder anti-SWC3 [1:50 verdünnt]) und eine erneute Inkubation für 30 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$ . Durch eine zweimalige Zentrifugation bei  $300 \times g$  für 10 Minuten mit Abnahme des erhaltenen Überstandes und Resuspension der Zellen in frischem PBS/EDTA wurde nicht gebundener Antikörper entfernt. Nach dem zweiten Waschschrift wurden die Zellen in  $80 \mu\text{l}$  PBS/EDTA pro  $10^7$  Zellen aufgenommen. Zur weiteren Markierung wurden nun  $10 \mu\text{l}$  Microbeads-Lösung pro  $10^7$  Zellen zugesetzt und für 30 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschriften wurden die Zellen in 2ml PBS/EDTA aufgenommen und auf eine mit PBS/EDTA prääquilibrierte und im Magneten fixierte LS Säule appliziert. Es wurde dreimal mit 5ml PBS/EDTA nachgespült, bevor die Säule aus dem Magneten genommen und die Zellen mit 5ml PBS/EDTA aus der Säule ausgespült wurden. Von den so erhaltenen Zellen wurde ein Aliquot ( $250 \mu\text{l}$ ) abgenommen und für die Durchflusszytometrie bearbeitet [s. Kap. 3.1.2.17]. Ergab die Kontrolle im Durchflusszytometer eine noch unzureichende Reinheit der Zellen ( $<95\%$ ), so wurde die Aufreinigung wiederholt und im Anschluss erneut die Reinheit der Population kontrolliert. War sie zufriedenstellend, so wurden die Zellen in zwei Eppendorfgefäße überführt, durch Zentrifugation bei  $300 \times g$  für 10 Minuten pelletiert und für die DNA-Extraktion vorbereitet [s. Kap. 3.1.2.1.2].

### 3.1.2.17 Durchflusszytometrie

Die Immunfluoreszenzmarkierung wurde mit jeweils  $5 \times 10^5$  Zellen durchgeführt. Nach Absättigung unspezifischer Immunglobulin-Bindungsstellen durch eine 20-minütige Inkubation auf Eis mit Ziegen-gammaglobulin (30ng) wurde der Erstantikörper zugefügt und die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert (Gesamtvolumen  $50 \mu\text{l}$ ). Dem Aufnehmen der Zellen in  $150 \mu\text{l}$  PBS/FKS folgte eine Zentrifugation bei  $550 \times g$  für 5 min. Der nun zugesetzte FITC-markierte Zweitantikörper (Ziege-anti-Maus IgG, 1:250 verdünnt) wurde wiederum für 30 min auf Eis inkubiert und die Zellen erneut

gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 100µl PBS/FKS aufgenommen. Als Kontrolle für alle Markierungen dienten unbehandelte sowie nur mit dem Fluoreszenzkonjugat behandelte Zellen.

Zur Kontrolle der Reinheit der sortierten PBMC-Subpopulationen [s. Kap. 3.1.2.16] wurde ein 250µl-Aliquot der sortierten Population untersucht. Da die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen sowie die Markierung der Zellen mit dem Erstantikörper schon für die Sortierung erfolgte, wurde diesem Aliquot lediglich der Zweitantikörper (FITC-konjugiertes anti-Maus-IgG aus der Ziege) zugesetzt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Waschschrift waren die Zellen bereit zur Untersuchung im Durchflusszytometer.

Die Messungen der Immunfluoreszenz erfolgte mit Hilfe eines Durchflusszytometers (FACSCalibur, Becton Dickinson). Darin werden die in Suspension vorliegenden fluoreszenzmarkierten Zellen so an Lasern vorbeigeführt, dass der Lichtstrahl jeweils eine einzelne Zelle im rechten Winkel trifft. Für jede einzelne Zelle werden

- das Vorwärtsstreulicht („Forward Scatter“), welches mit der Zellgröße korreliert
- das Seitwärtsstreulicht („Side Scatter“), welches ein Maß für die intrazelluläre Granulation darstellt
- sowie ein (oder mehrere) fluoreszenzabhängige(r) Parameter

bestimmt. Unmittelbar vor der Untersuchung der Proben im Durchflusszytometer wurde den Zellen 100µl Propidiumiodid (1µg/ml) zugesetzt, um durch eine Anfärbung der toten Zellen diese von lebenden unterscheiden zu können. Zunächst wurden mit Hilfe der unbehandelten Zellen die Einstellung des Gerätes vorgenommen sowie tote Zellen und Zelltrümmer durch das Setzen elektronischer Fenster von den Analysen ausgeschlossen. Erst dann konnten die Proben auf ihre markierungsspezifische Fluoreszenz hin untersucht werden. Von jeder Probe wurden 10.000 innerhalb des gesetzten elektronischen Fensters gelegene Ereignisse analysiert. Die Gewinnung und Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms ‚CellQuest‘.