

3.2 Methoden

3.2.1 Gentechnologische Methoden

3.2.1.1 DNA-Präparation

3.2.1.1.1 Extraktion von DNA aus Leukozyten des Blutes

Hierfür standen bereits vorgefertigte *“buffy coats”* zur Verfügung. Mit diesem Begriff wird die Zellsuspension aus Leukozyten bezeichnet, die nach Zentrifugation von Blut zwischen den Erythrozyten und dem Plasma in einer dünnen Schicht angereichert wird. Die Extraktion zellulärer DNA aus *“buffy coats”* wurde mit dem Qiagen Dneasy Tissue Kit durchgeführt. Dabei wird die zelluläre DNA nach Lysierung der Zellen selektiv an eine Silika-Gel-Membran gebunden. Kontaminationen werden durch Zugabe verschiedener Waschpuffer und durch Zentrifugation entfernt.

Für die Extraktion wurden 50-100 µl *“buffy coat”* mit 20 µl Proteinase K versetzt und mit PBS auf ein Volumen von 220 µl gebracht. Nach Zugabe von 200 µl AL-Puffer wurden die Proben für 10 min bei 70°C inkubiert. Im Anschluß wurden 200 µl Ethanol hinzugegeben, die Proben gevortext und die Lösung auf eine Säule mit einer Silika-Gel-Membran pipettiert und zentrifugiert (8000 rpm, 1 min, RT, Heraeus). Nach Waschen mit jeweils 500 µl Puffer AW1 und AW2 wurde die DNA durch Zugabe von 200 µl AE-Puffer eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.1.1.2 Präparation von Plasmid-DNA

Für die Präparation von Plasmid-DNA aus Wirtsbakterien wurde das QIAprep 8 Miniprep Kit verwendet, das auf dem gleichen Prinzip beruht wie das QIAquick PCR Purification Kit zur Aufreinigung von PCR-Produkten (Kap. 3.2.1.4.1). Die Präparation besteht aus drei Schritten. Im ersten Schritt werden die Bakterien mit einem alkalischen Puffer lysiert und das Lysat mit einem neutralisierenden Puffer mit hoher Salzkonzentration gemischt. Das Lysat wird durch Zentrifugation von denaturierten und präzipitierten Zelltrümmern gereinigt. Im zweiten Schritt wird das gereinigte Lysat in eine Minisäule pipettiert. Im Innern der Säule bindet die DNA an die Silika-Gel-Membran. Im letzten Schritt werden ungebundene Lysatbestandteile durch mehrmaliges Waschen mit einem Waschpuffer herausgewaschen, bevor die DNA eluiert wird.

Für die Präparation von Plasmid-DNA wurde von der Bakterienkolonie, die das gewünschte rekombinante Plasmid trug, eine Übernachtskultur angelegt (Kap. 3.2.1.8). Von der Übernachtskultur wurde ein 2 ml Aliquot entnommen, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (13000 rpm, 10 min, 4°C, Heraeus). Der

Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 250 µl Puffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl Puffer P2 wurde das Reaktionsgefäß 4-6x kopfüber geschwenkt. Nach 5 min wurden 350 µl N3-Puffer hinzupipettiert, die Mischung vorsichtig gemischt und das Reaktionsgefäß erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und in eine Minisäule eines QIAprep 8 Streifens pipettiert, der in einer QIAvac 6S Apparatur saß. Die Apparatur wurde an eine Vakuum-Wasserstrahlpumpe angeschlossen. Während die DNA an die Membran gebunden wurde, wurde die Flüssigkeit durch die Membran abgesaugt. Das Vakuum wurde abgestellt und die Minisäule einmal mit 1 ml PB-Puffer und zweimal mit 1 ml PE-Puffer gespült. Nach jeder Pufferzugabe wurde das Vakuum angestellt und die Flüssigkeit durch die Membran gesaugt. Zur Entfernung restlichen Alkohols des PE-Puffers blieb das Vakuum nach dem letzten Waschschrift für weitere 5 min angelegt. Nach Entfernen des Vakuums wurde der Deckel der QIAvac 6S Apparatur entfernt, und von der Öffnung der Minisäule wurden restliche Flüssigkeitstropfen mit Zellstoff entfernt. Für die Elution der Plasmid-DNA wurde ein Plastikständer mit 1,2 ml großen Mikroröhrchen in die QIAvac 6S Apparatur eingesetzt und der Deckel wieder aufgesetzt. Zur Elution der DNA wurden 120 µl EB-Puffer in die Minisäule pipettiert und das Vakuum angelegt. Die eluierte Plasmid-DNA wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 min in einer SpeedVac-Zentrifuge zentrifugiert, um restlichen Alkohol zu entfernen. Nach Bestimmung der DNA-Konzentration (Kap. 3.2.1.5) wurde die DNA bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.1.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR lassen sich bestimmte Bereiche einer beliebigen Desoxyribonukleinsäure (DNA) als Template gezielt vervielfältigen (Mullis et al., 1986). Das Prinzip der PCR basiert auf der Trennung des DNA-Doppelstranges (dsDNA) in zwei Einzelstränge (ssDNA) durch Hitze (Denaturierung), der darauf folgenden Anlagerung sequenzspezifischer Oligonukleotide, sogenannter Primer, an die freien 5'-Enden der beiden ssDNA (Annealing) und der anschließenden Aktivität einer thermostabilen DNA-abhängigen DNA-Polymerase, die in Gegenwart freier Desoxynukleosid-Triphosphate (dNTP) die Primer verlängert (Elongation) und den zu den ssDNA komplementären Strang synthetisiert. Bei diesem Zyklus, bestehend aus Denaturierung, Annealing und Elongation, werden unterschiedliche Temperaturen durchlaufen. Während die Denaturierung der dsDNA bei Temperaturen von über 90°C erfolgt, wird die Annealing-Temperatur durch die Länge und den G-C-Gehalt der Primer bestimmt und liegt in der Regel zwischen 50°C und 60°C. Der letzte Schritt, die Elongation, erfolgt bei einer Temperatur zwischen 68°C und 72°C. Mit jedem

Durchlaufen eines Zyklus wird die Anzahl der DNA-Moleküle exponentiell amplifiziert (2^n bei n Zyklen). Die neusynthetisierte DNA dient in dem nachfolgenden Zyklus selbst wieder als Template. Neben der Template-DNA, den spezifischen Primern und der hitzebeständigen Polymerase enthält der Reaktionsansatz für optimale Reaktionsbedingungen einen geeigneten Puffer, $MgCl_2$, dNTP und in einigen Ansätzen auch DMSO. Die Magnesium-Ionen haben einen positiven Einfluss auf die Denaturierung der dsDNA, das Primer-Annealing, die Produktspezifität und -ausbeute und sind außerdem ein Kofaktor für die meisten DNA-Polymerasen. Das DMSO steigert die Spezifität und erleichtert die Amplifizierung G-C-reicher Sequenzen.

3.2.1.2.1 Amplifikation von Virus-DNA

Für die Amplifizierung von Virus-DNA zur Klonierung in Expressionsvektoren (Kap. 3.2.1.6) wurde das Expand™ High Fidelity PCR System verwendet, das ein Enzymgemisch beinhaltet, bestehend aus der thermostabilen *Taq*-DNA-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermus aquaticus* und der *Pwo*-DNA-Polymerase aus *Pyrococcus woesei*. Aufgrund der 3'-5'-Exonuklease-Aktivität der *Pwo*-DNA-Polymerase wird eine Korrektur des neusynthetisierten DNA-Stranges ermöglicht. Dadurch wird der Einbau fehlerhafter Nukleotide um etwa das Dreifache verringert. Die PCR-Ansätze wurden auf Eis in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße pipettiert. Die Zusammensetzung der 50 μ l umfassenden Reaktionsansätze ist in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: PCR-Ansatz für Expand™ High Fidelity PCR System

Komponenten	Endkonzentration oder absolute Menge	μ l/Ansatz
10 x Puffer (mit $MgCl_2$)	1 x	5
dNTP (2.5 mM/dNTP)	je 0,4 μ M	8
DNA-Polymerase	1 U	1
Template	150–500 ng	x
Primer (10 μ M)	je 0,4 μ M	2
ddH ₂ O		ad 50

Nach dem Herstellen des Ansatzes wurde dieser sofort in einen Thermozykler gestellt und die PCR gestartet.

Die Zyklerbedingungen wurden folgendermaßen experimentell bestimmt:

Vordenaturierung:	95°C	3 min	
Denaturierung:	96°C	30 sec	} 40x
Primer-Annealing:	50-60°C	30 sec	
Elongation:	70°C	10 min	
Elongation:	72°C	30 min	
Lagerung:	4°C	auf Dauer	

Zur Bestimmung der Größe, Menge und Reinheit des Template wurde nach Beendigung der PCR ein Aliquot des Ansatzes in der Agarosegelelektrophorese analysiert (Kap. 3.2.1.3.1). Stimmt die Größe des Template im Gel mit der rechnerisch ermittelten Fragmentgröße überein, wurde das Template mittels QIAquick PCR Purification Kit gereinigt (Kap. 3.2.1.4.1) und sequenziert (Kap. 3.2.1.10) oder kloniert (Kap. 3.2.1.6). Falls Nebenbanden auftraten, wurde das Template aus einem präparativen Agarosegel extrahiert (Kap. 3.2.1.4.2).

3.2.1.2.2 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR ist eine Methode, um Wirtsbakterien, die nach Transformation das erwünschte rekombinante Plasmid tragen, zu identifizieren. Dafür werden neben Insert-spezifischen Primern, meist PCR-Primer mit denen das Insert amplifiziert wurde, auch Vektor-spezifische Primer eingesetzt, die das integrierte Gen flankieren. Für die Kolonie-PCR wurde die Polymerase AmpliTaq Gold™ verwendet, die in einem Hot-Start (95°C für 12 min) vor der PCR aktiviert wurde. Auf diese Weise wurden Fehlbindungen der Primer sowie Primeroligomere vermieden und damit die Ausbeute an spezifischen Produkt erhöht. Für die PCR wurde eine Stammlösung angefertigt (Tabelle 11), die bei -20°C gelagert werden konnte. Erst direkt vor der PCR wurde der Reaktionsansatz, ohne Template, in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße pipettiert (Tabelle 12).

Tabelle 11: Stammlösung für AmpliTaq Gold™ Polymerase

Komponenten	Endkonzentration oder absolute Menge	µl/Ansatz
10x Puffer (ohne MgCl ₂)	1x	2,5
dNTP (10 mM/dNTP)	je 200 µM	0,5
MgCl ₂ (25 mM)	2 mM	2
DMSO	5%	1,25
ddH ₂ O		3,55

Tabelle 12: PCR-Ansatz für AmpliTaq Gold™ Polymerase

Komponenten	Endkonzentration oder absolute Menge	µl/Ansatz
Stammlösung	1x	9,8
AmpliTaQ Gold™ Polymerase (5U/µl)	1 U	0,2
Primer (10 µM)	je 1 µM	1
ddH ₂ O		ad 25 µl

Nach Fertigstellung des Reaktionsansatzes wurde mittels einer Pipettenspitze etwas Material von einer auf einer selektiven LB-Agar-Platte gewachsenen Bakterienkolonie abgenommen und direkt in den Ansatz überführt. Restliches, noch an der Pipettenspitze haftendes Material wurde auf einer mit einem Raster versehenen selektiven LB-Agar-Platte abgestreift. Die Platte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert und diente als Ausgangsmaterial für das Anlegen von Übernachtskulturen (Kap. 3.2.1.8) positiver Bakterienkolonien.

Für die Kolonie-PCR wurden folgende Zyklusbedingungen ermittelt:

Vordenaturierung:	95°C	12 min	
Denaturierung:	95°C	20 sec	} 45 x
Primer-Annealing:	50-60°C	30 sec	
Elongation:	72°C	2 min	
Elongation:	72°C	15 min	
Lagerung:	4°C	auf Dauer	

Nach der PCR wurden die Amplifikate mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (Kap. 3.2.1.3.1). Dadurch wurden Bakterienkolonien, die das rekombinante Plasmid trugen, anhand der erwarteten Fragmentgröße identifiziert. Von den positiven Klonen wurde eine Übernachtskultur angelegt (Kap. 3.2.1.8), die Plasmid-DNA präpariert (Kap. 3.2.1.1.2) und sequenziert (Kap. 3.2.1.10).

3.2.1.3 Elektrophorese

Unter Elektrophorese versteht man die Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld. Unterschiedliche Ladung und Größe der Teilchen bewirken eine unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeit, wodurch die einzelnen Komponenten eines Substanzgemisches aufgetrennt werden. Zur Auftrennung von Nukleinsäuren wurden horizontale Agarosegelelektrophoresen durchgeführt

(Kap. 3.2.1.3.1). Die Auftrennung von Proteingemischen erfolgte in vertikalen Polyacrylamidgelen (Kap. 3.2.2.7).

3.2.1.3.1 Agarosegelelektrophorese

Bei der Agarosegelelektrophorese werden die negativ geladenen Nukleinsäuren aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe und Konformation und ihrer daraus resultierenden unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld voneinander getrennt. So wandern niedermolekulare und zirkularisierte Nukleinsäuren schneller als höhermolekulare und lineare Nukleinsäuren, da aufgrund der Siebstruktur der Agarose die einzelnen Poren kleineren Molekülen gegenüber einen geringeren Widerstand leisten als größeren Molekülen.

Gelelektrophoretisch aufgetrennte DNA-Proben wurden durch Ethidiumbromid, das im Elektrophoresepuffer enthalten war, im Agarosegel sichtbar gemacht. Das Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen der Nukleinsäuren und nach Anregung mit UV-Licht erscheint der Ethidiumbromid-Nukleinsäure-Komplex im sichtbaren Bereich (500-590 nm) als rotorange leuchtende Bande und ermöglicht die Detektion von bis zu 5 ng DNA. Die Größen- und Konzentrationsbestimmung der einzelnen Fragmente (Banden) erfolgte durch Vergleich mit den Banden der DNA-Längenstandards ϕ X174/*Hae*III, λ /*Hind*III und λ /*Bst*EII (Tabelle 13, Kap. 3.2.1.5.1), die parallel zu den DNA-Proben auf das Gel aufgetragen wurden.

Zur Herstellung von 1%igen (w/v) Agarosegelen wurde Agarose nach Auflösen in kochendem Elektrophoresepuffer und anschließender Abkühlung auf etwa 65°C in eine horizontale Gelelektrophoresekammer gegossen. Durch das Einsetzen eines Kammes in die noch flüssige Agarose bildeten sich nach dem Gelieren der Agarose Geltaschen aus. Je nach Verwendungszweck des Gels variierte die Größe der Taschen. Für analytische Zwecke (DNA-Konzentrationsbestimmung, Restriktionsenzymanalysen) wurden kleine Taschen benutzt, für präparative Zwecke (Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen) große Taschen. Nachdem sich die Agarose durch Abkühlung verfestigt hatte, wurde das Gel mit Elektrophoresepuffer bedeckt und der Kamm gezogen. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 1/5 Volumen Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei konstanter Spannung von etwa 8 V pro cm Elektrodendistanz. Der Elektrophoreseverlauf wurde anhand des Farbmarkers Bromphenolblau oder direkt durch Visualisierung des Bandenmusters mit einer UV-Handlampe verfolgt. Nach hinreichender Auftrennung der DNA-Banden wurde das Gel zur Dokumentation auf

einen UV-Transilluminator gelegt, bei einer Wellenlänge von 302 nm das Bandenmuster sichtbar gemacht und mit einer Fotodokumentationsanlage fotografiert.

3.2.1.4 Aufreinigung von PCR-Produkten

Abhängig von der Reinheit amplifizierter DNA-Fragmente wurden zwei Methoden der Aufreinigung angewendet. PCR-Produkte, die frei von kontaminierenden Nebenprodukten waren, wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt. Traten Nebenbanden auf, wurden die PCR-Produkte nach präparativer Agarosegelelektrophorese aus dem Gel extrahiert. Beide Methoden wurden auch verwendet, um PCR-Produkte und Plasmide nach der Restriktionsenzymanalyse zu reinigen.

3.2.1.4.1 Aufreinigung mittels QIAquick PCR Purification Kit

Dieses Kit ermöglicht die Aufreinigung von einzel- und doppelsträngiger DNA mit einer Größe von 100 bp bis 10 kbp über eine Minisäule. Dabei wird die selektive Bindung von DNA in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen und bei neutralem pH-Wert an eine Silika-Gel-Membran ausgenutzt, während Primer, Nukleotide, Salze und Polymerasen die Membran ungehindert passieren und durch mehrere aufeinanderfolgende Wasch- und Zentrifugationsschritte entfernt werden. Die gereinigte DNA wird mit Elutionspuffer oder ddH₂O eluiert. Die Bindungskapazität einer Minisäule beträgt bis zu 10 µg DNA je Säule.

Für die Aufreinigung wurde der gesamte PCR-Reaktionsansatz mit dem fünffachen Volumen an PB-Puffer gemischt. Das Gemisch wurde auf eine QIAquick-Minisäule pipettiert, die in einem 2 ml Auffanggefäß saß. Für die Bindung der DNA an die Silika-Gel-Membran wurde die Säule zentrifugiert (13000 rpm, 1 min, RT, Heraeus). Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule wieder in das Auffanggefäß gesetzt. Zum Waschen der Säule wurden 750 µl PE-Puffer auf die Silika-Gel-Membran gegeben. Nach erneutem Zentrifugieren wurde der Durchfluss entfernt, die Säule in das Auffanggefäß gesetzt und ein weiteres Mal zentrifugiert, um überschüssigen Alkohol zu entfernen. Anschließend wurde die Minisäule in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt und die DNA durch Zugabe von 50 µl EB-Puffer und anschließendem einminütigem Zentrifugieren eluiert. Restlicher Alkohol wurde durch fünfminütiges Zentrifugieren unter Anlegen eines Vakuums in einer SpeedVac-Zentrifuge entfernt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die gereinigte DNA bei -20°C gelagert.

3.2.1.4.2 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Extraktion und Reinigung von 70 bp bis 10 kbp großen DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem Perfectprep Gel Cleanup Kit. Die Aufreinigung beruht

auf dem gleichen Prinzip wie die Reinigung von PCR-Produkten mit dem QIAquick PCR Purification Kit. Nach Zugabe eines Puffers mit hoher Salzkonzentration wird das DNA-haltige Agarosestück unter Wärmezufuhr verflüssigt. Die Lösung wird in eine Minisäule mit einer Glasfaser-Membran gegeben, an die die DNA bindet. Durch mehrere Wasch- und Zentrifugationsschritte werden Verunreinigungen wie Primer, Salze, Enzyme und unspezifische Nebenprodukte herausgewaschen. Die gereinigte DNA wird mit Elutionspuffer oder ddH₂O eluiert. Bis zu 10 µg DNA kann je Säule gebunden werden.

Für die Extraktion von DNA aus einem präparativen Agarosegel wurde die erwünschte DNA-Bande unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und gewogen. Zu dem Gelfragment wurde das dreifache Volumen an Bindungspuffer gegeben. Dabei entsprach 1 mg = 1 µl. Das Gemisch aus Gel und Bindungspuffer wurde zum Verflüssigen der Agarose in einem 50°C warmen Wasserbad inkubiert. Im Abstand von 2-3 min wurde das Reaktionsgefäß gevortext. Nachdem sich das Gelstück vollständig verflüssigt hatte, wurde ein Volumen Isopropanol zugegeben. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurde die Lösung gemischt. Eine Minisäule wurde in ein 2 ml Auffanggefäß gesetzt und bis zu 800 µl der Lösung auf die Membran pipettiert. Die Säule wurde zur Bindung der DNA zentrifugiert (13000 rpm, 1 min, RT, Heraeus). Nach einmaligem Waschen mit 750 µl 1x Waschpuffer wurde die DNA durch Zugabe von 30 µl Elutionspuffer und anschließendem einminütigem Zentrifugieren eluiert. Restlicher Alkohol aus dem Waschpuffer wurde durch fünfminütiges Zentrifugieren in einer SpeedVac-Zentrifuge entfernt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die extrahierte und gereinigte DNA bei -20°C aufbewahrt.

3.2.1.5 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der DNA-Konzentration war für einige Versuche unerlässlich. Für die Berechnung der erforderlichen Menge an Plasmid-DNA und DNA-Fragment für die Ligationsreaktion reichte eine Abschätzung der DNA-Konzentration im Agarosegel aus. Eine exakte Konzentrationsbestimmung mittels Fluorometer war für Sequenzierungsreaktionen erforderlich.

3.2.1.5.1 Konzentrationsabschätzung im Agarosegel

Bei dieser Methode wird die Bandenstärke der Probe mit der Bandenstärke parallel aufgetragener DNA-Größenmarker visuell verglichen und die DNA-Konzentration abgeschätzt. Die Nachweisgrenze liegt hierbei in einer Größenordnung von etwa 5 ng DNA je Bande. Als DNA-Größenmarker wurden die 5.386 bp lange DNA des *E.coli*

Bacteriophagen ϕ X174 und die 48.502 bp lange DNA des Phagen λ verwendet, die durch die Restriktionsenzyme *Hae*III bzw. *Bst*EII und *Hind*III in unterschiedlich große DNA-Fragmente zerschnitten worden waren. Die Konzentration der Größenmarker betrug 150 ng/ μ l. Abhängig von dem aufgetragenen Volumen entsprach jedes aufgetrennte Fragment der Größenmarker einer bestimmten DNA-Menge (Tabelle 13), so dass unter Berücksichtigung des aufgetragenen Probenvolumens die Banden der Proben quantitativ erfasst werden konnten.

Tabelle 13: DNA-Gehalt der Größenstandard-Banden in ng/ μ l

ϕ X174/ <i>Hae</i> III (in bp)	DNA-Gehalt (in μ g/ μ l)	λ <i>Bst</i> EII (in bp)	DNA-Gehalt (in μ g/ μ l)	λ <i>Hind</i> III (in bp)	DNA-Gehalt (in μ g/ μ l)
1353	38,7	8454	26,1	23130	71,5
1078	30,0	7242	22,4	9416	29,1
872	24,3	6369	19,7	6557	20,3
603	16,8	5686	17,6	4361	13,5
310	8,6	4822	14,9	2322	7,2
281	7,8	4324	13,4	2027	6,3
271	7,6	3675	11,4	564	1,7
234	6,5	2323	7,2	125	0,4
194	5,4	1929	6,0		
118	3,3	1371	4,2		
72	2,0	1264	3,9		
		702	2,2		
		224	0,7		
		117	0,4		

3.2.1.5.2 Fluorometrische Konzentrationsbestimmung

Diese Methode der Konzentrationsbestimmung beruht darauf, dass Fluoreszenzfarbstoffe Licht einer bestimmten Wellenlänge aufnehmen (Absorption) und als Licht einer anderen Wellenlänge wieder abgeben können (Emission). Die zu untersuchende Probe wurde dazu mit einem DNA-spezifischen Bisbenzimid-Fluoreszenzfarbstoff (Hoechst 33258) gemischt, der nach Interkalierung in die DNA fluoresziert. Die Anregung erfolgt bei einer Wellenlänge von 365 nm. Die emittierte Fluoreszenz wurde bei 460 nm in einem Fluorometer (TD-360 Mini) gemessen.

Vor Beginn der Messung wurden 100 ml Messpuffer frisch zubereitet. Zur Kalibrierung des Geräts wurden 2 ml Messpuffer in eine Plastikkuvette pipettiert und als Nullwert vermessen. Zu den 2 ml Messpuffer wurden 2 μ l Kalbsthymus-DNA (c = 120 ng/ μ l) gegeben, kurz gevortext und als Eichwert vermessen. Nach Verwerfen der Probe wurde die Küvette mehrmals mit destilliertem Wasser gespült. Für die Messung der Probe wurde erneut der Nullwert bestimmt und zur Konzentrationsbestimmung 2 μ l

DNA-Lösung zum Messpuffer hinzupipettiert, kurz gevortext und gemessen. Die Konzentration konnte direkt vom Gerät in ng/µl abgelesen werden.

3.2.1.6 Klonierung von PCR-Produkten

Unter Klonierung versteht man die Integration von DNA-Fragmenten, meist PCR-Produkte, in geeignete Plasmid-Vektoren und die Transformation dieser rekombinanten Plasmide in kompetente Wirtsbakterien. Die Bedeutung dieser Methode liegt zum einen darin, dass durch die Bakterien-unabhängige episomale Vermehrung der Plasmide das durch Ligation integrierte DNA-Fragment um ein Vielfaches vermehrt wird (klonale Amplifikation). Zum anderen kann über das Plasmid ein Gen in ein Bakterium gebracht werden, das mit Hilfe der bakteriellen Expressionsmaschinerie in Protein übersetzt wird. In dieser Arbeit wurden PCR-Produkte nach dem klassischen Klonierungsverfahren nach Sambrook (1989), bestehend aus Restriktionsenzymanalyse und Ligationsreaktion, kloniert.

3.2.1.6.1 Restriktionsenzymanalyse

Für die gerichtete Klonierung von PCR-Produkten in die Vektoren pTriEx-1.1 und pGEX-6P-1 wurden Plasmid-DNA und die durch PCR amplifizierten, viralen DNA-Fragmente durch Doppelverdau mit Restriktionsenzymen geschnitten. Restriktionsenzyme sind bakterieneigene Endonukleasen, die sequenzspezifisch doppelsträngige DNA, z.B. Phagen-DNA, erkennen und abbauen können. Dabei spalten sie die Phosphodiesterbindungen beider Einzelstränge eines DNA-Moleküls hydrolytisch.

Für den Verdau wurden 25 µl gereinigtes PCR-Produkt und 1 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Der 50 µl umfassende Ansatz (Tabelle 14) wurde in ein 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß pipettiert und über Nacht in einem 37°C warmen Wasserbad inkubiert. Die Analyse des Verdau erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese (Kap. 3.2.1.3.1).

Tabelle 14: Pipettierschema für Verdau mit Restriktionsenzymen

Komponenten	Endkonzentration oder absolute Menge	µl/Ansatz
10 x NEB Puffer	1 x	5
Restriktionsenzym	je 10-20 U	je 1
Vektor	1 µg	x
PCR-Produkt		25
ddH ₂ O		ad 50

Abhängig von den verwendeten Enzymen wurde den Ansätzen BSA in einer Endkonzentration von 1 mg/ml zugesetzt. Nach dem Verdau wurden das linearisierte

Plasmid und das PCR-Produkt gereinigt, um Pufferbestandteile und Enzyme zu entfernen. Abhängig von der Länge des aus dem Vektor herausgeschnittenen Nukleotids wurde der Vektor wie das DNA-Fragment mittels QIAquick PCR Purification Kit gereinigt (Kap. 3.2.1.4.1) oder aus einem Agarosegel extrahiert (Kap. 3.2.1.4.2).

3.2.1.6.2 Ligationsreaktion

Nach dem Verdau von Plasmid-DNA und PCR-Produkt mit Restriktionsenzymen wurde das linearisierte Plasmid mit der geschnittenen DNA ligiert. Voraussetzung dafür war, dass die durch Hydrolyse mit Restriktionsenzymen erzeugten freien Enden der zu ligierenden DNA-Fragmente kohäsiv, also zueinander passend waren. Die komplementären Enden von Plasmid-DNA und PCR-Produkt konnten in diesem Fall vorübergehend über Wasserstoffbrückenbindungen basenpaaren. Durch Zugabe der T4 DNA-Ligase wurden die Fragmente durch Ausbildung von 3'-5'-Phosphodiesterbindungen kovalent miteinander verbunden.

Für die gerichtete Ligation wurde ein Molekülverhältnis Vektor:Insert von 1:3 gewählt. Der 20 µl umfassende Ligationsansatz enthielt folgende Komponenten in den angegebenen Volumina:

Vektor	x µl
Insert	y µl
10x Puffer	2 µl
T4 DNA-Ligase	1 µl
ddH ₂ O	ad 20 µl

Der Ligationsansatz wurde für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation rekombinanter Plasmide in kompetente *E. coli*-Zellen (Kap. 3.2.1.7).

3.2.1.7 Transformation von Bakterien mit rekombinanten Plasmiden

Unter Transformation versteht man das Einschleusen von Fremd-DNA in ein Empfängerbakterium. Dadurch lässt sich zum einen Virus-DNA klonal amplifizieren, zum anderen eignet sich diese Methode zur Expression rekombinanter Proteine. Für beide Anwendungen mussten zuvor rekombinante Plasmide erzeugt werden (Kap. 3.2.1.6).

3.2.1.7.1 Klonale Amplifikation von DNA

Für die klonale Amplifikation von DNA wurden rekombinante Plasmide in *E. coli* DH5α transformiert. Zur Transformation wurden 100 µl Zellsuspension nach fünfminütigem Auftauen auf Eis vorsichtig gemischt. 5 µl des Ligationsansatzes (Kap. 3.2.1.6.2) wurden mit eiskalten Pipettenspitzen zu der Zellsuspension gegeben und gemischt.

Dieser Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurden 20 µl und 50 µl des Ansatzes auf vorgewärmte Ampicillin-haltige (100 µg/ml) LB-Agar-Platten pipettiert und mittels eines sterilen Glasspatels auf der Nährbodenoberfläche gleichmäßig verteilt. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Identifizierung von Bakterienkolonien, die das rekombinante Plasmid trugen, wurde von bis zu zwanzig gewachsenen Kolonien eine Kolonie-PCR durchgeführt (Kap. 3.2.1.2.2). Von positiven Klonen wurde eine Übernachtskultur angefertigt (Kap. 3.2.1.8), die Plasmid-DNA präpariert (Kap. 3.2.1.1.2) und sequenziert (Kap. 3.2.1.10).

3.2.1.7.2 Herstellung von Expressionsklonen

Für die Erzeugung von Expressionsklonen wurden rekombinante Plasmide in *E.coli* TOP 10, in *E.coli* Rosetta (DE3) pLacI und in *E.coli* Rosetta™ transformiert. Während pTriEx- und pGEX-Klone durch Sequenzierung auf korrekte Nukleotidabfolge und richtigen Leserahmen kontrolliert worden waren und direkt in Rosetta(DE3)pLacI Zellen bzw. in Rosetta™ Zellen transformiert werden konnten, mussten bei Verwendung des Echo™ Cloning Systems die bereits in der Arbeitsgruppe existierenden pUni/V5-His-TOPO-Klone vor ihrer Transformation in TOP 10-Zellen mit dem Akzeptorvektor pBAD/Thio-E™ fusioniert werden.

3.2.1.7.2.1 Fusion von pUni/V5-His-TOPO® mit pBAD/Thio-E™ und Transformation in TOP 10-Zellen

Das Echo™ Cloning System ermöglicht durch die Aktivität der vom Bakteriophagen P1 stammenden Cre-Rekombinase eine schnelle und einfache Klonierung von DNA-Fragmenten, da auf die klassischen Klonierungsschritte Restriktionsenzymanalyse und Ligationsreaktion verzichtet werden kann. Das System basiert auf dem Univektor Plasmid-Fusion System (Liu et al., 1998) und besteht aus einem Donorvektor (pUni/V5-His-TOPO®), der das zu exprimierende DNA-Fragment trägt, und einem Akzeptorvektor (pBAD/Thio-E™), der verschiedene regulatorische Einheiten für die Expression besitzt. Durch die Cre-Rekombinase werden beide Vektoren zu einem Vektor fusioniert (pBAD/Thio-E-pUni/V5-His-TOPO), indem dieses Enzym beide Vektoren an einer spezifischen Erkennungsstelle (*lox-site*) spaltet und anschließend miteinander fusioniert.

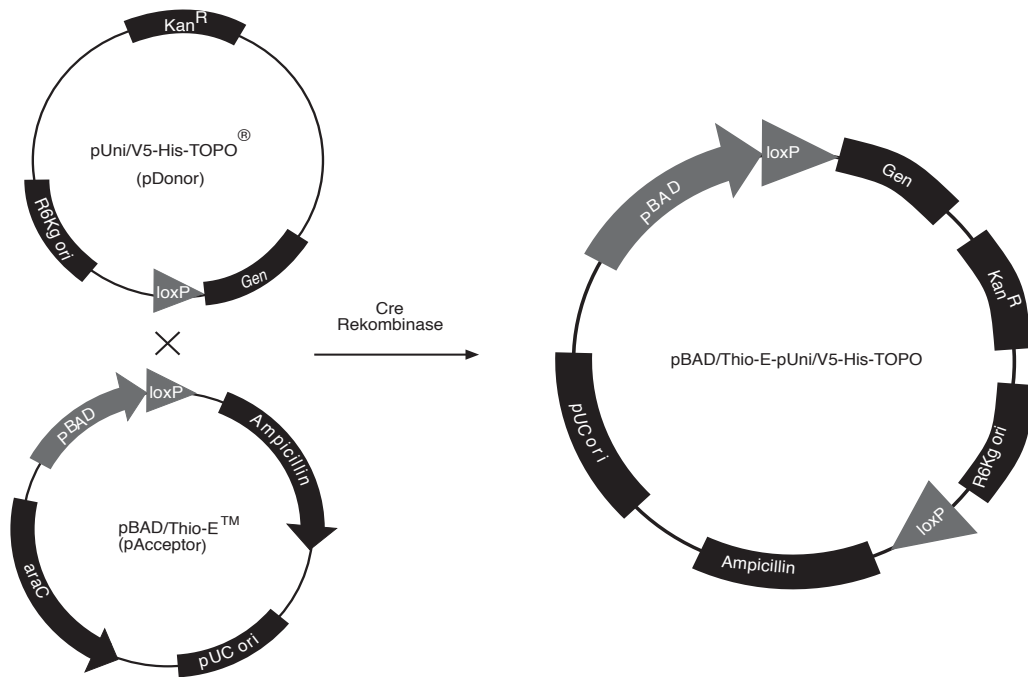


Abb. 4: Das Echo™ Cloning System

Der Insert tragende Donorvektor (pUni/V5-His-TOPO®), der als weitere strukturelle Elemente neben dem bakteriellen Replikationsursprung (R6K γ ori) und einem Kanamycin-Resistenzgen eine *lox*-site aus 34 bp trägt, wird durch die Aktivität der *Cre*-Rekombinase mit dem Akzeptorvektor (pBAD/Thio-E™) fusioniert. Der Akzeptorvektor verfügt ebenfalls über eine *lox*-site, über die die Fusion mit dem Donorvektor erfolgt. Als weitere Struktureinheiten findet man im Akzeptorvektor eine Promotorregion (pBAD), das *araC*-Gen, dessen Produkt die Transkription positiv und negativ beeinflussen kann, den Replikationsursprung (pUC ori) und ein Ampicillin-Resistenzgen.

Für die Fusionsreaktion wurde folgender Ansatz auf Eis hergestellt:

pUni/V5-His-TOPO® (100 ng)	x μ l
pBAD/Thio-E™ (100 ng)	1 μ l
10x Rekombinase-Puffer	2 μ l
<i>Cre</i> -Rekombinase	1 μ l
ddH ₂ O	ad 20 μ l

Der Ansatz wurde für 20 min bei 37°C und anschließend zur Inaktivierung der *Cre*-Rekombinase für 5 min in einem 65°C warmen Wasserbad inkubiert, bevor er auf Eis gestellt wurde. Für die Transformation in TOP 10-Zellen wurden 50 μ l kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und mit 5 μ l der Rekombinasereaktion vorsichtig gemischt. Nach Hitzeschock in einem 42°C warmen Wasserbad für 30 sec wurde der Ansatz auf Eis gestellt, 450 μ l SOC-Medium zugegeben und für 45 min bei 37°C auf einem Schüttler (200 rpm) inkubiert. 50 μ l des Ansatzes wurden auf vorgewärmte Kanamycin-haltige (75 μ g/ml) LB-Agar-Platten mittels sterilem Glasspatel ausplattiert. Der restliche Ansatz wurde zentrifugiert (3000 rpm, 10 min, 4°C, Heraeus), das Pellet in 50 μ l SOC-Medium resuspendiert und ebenfalls ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei

37°C inkubiert. Positive Klone wurden nach Anlegen einer Übernachtskultur (Kap. 3.2.1.8) und Präparation der Plasmid-DNA (Kap. 3.2.1.1.2) durch Verdau mit den Restriktionsenzymen *SacI* und *XhoI* oder *HindIII* identifiziert (Kap. 3.2.1.6.1) und die Richtigkeit der Nukleotidabfolge und des Leserahmens durch Sequenzierung der präparierten Plasmid-DNA kontrolliert (Kap. 3.2.1.10). Ein Teil der Übernachtskultur diente zur Herstellung von Glyceroldauerkulturen (Kap. 3.2.1.9).

3.2.1.7.2.2 Transformation in Rosetta(DE3)pLacI und in Rosetta™

Für die Transformation in Rosetta(DE3)pLacI bzw. in Rosetta™ wurden 20 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und mit 10 ng rekombinanter Plasmid-DNA vorsichtig gemischt. Der Ansatz wurde für 5 min auf Eis inkubiert, gefolgt von einem Hitzeschock von 30 sec bei 42°C. Anschließend folgte eine nochmalige Inkubation auf Eis für 2 min. Nach Zugabe von 80 µl SOC-Medium wurde der Ansatz für 60 min bei 37°C auf einem Schüttler (200 rpm) inkubiert. Nach der Inkubation wurden 20 µl und 50 µl des Transformationsansatzes auf vorgewärmte, Glukose (1%)- und Antibiotika-haltige (100 µg/ml Ampicillin + 34 µg/ml Chloramphenicol) LB-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Für die Expression rekombinanter Proteine wurde eine Kolonie gepickt und eine Vorkultur angelegt.

3.2.1.8 Anlegen von Übernachtskulturen

Übernachtskulturen wurden zur klonalen Amplifikation rekombinanter Plasmide und als Vorkultur für die Expression heterologer Proteine angelegt. Dazu wurde mit einer sterilen Pipettenspitze etwas Koloniematerial von einer selektiven LB-Agar-Platte abgenommen und in ein Glasgefäß mit selektivem LB-Flüssigmedium abgeworfen. Für die klonale Amplifikation wurden in der Regel Reagenzgläser mit 5 ml LB-Flüssigmedium beimpft. Vorkulturen für die Proteinexpression wurden, abhängig von der Größe der Hauptkultur, in verschieden große, mit Schikanen versehene Erlenmeyerkolben angelegt. Das selektive LB-Medium für die Vorkulturen enthielt zur Unterdrückung der Expression zusätzlich 1% (w/v) Glukose. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler (200 rpm) inkubiert. Aus den Übernachtskulturen wurde die Plasmid-DNA präpariert (Kap. 3.2.1.1.2). Die Vorkulturen wurden für die Beimpfung der Hauptkultur zur Expression rekombinanter Proteine verwendet (Kap. 3.2.2.1).

3.2.1.9 Herstellen von Glyceroldauerkulturen

Um Bakterienklone längere Zeit bei -80°C lagern zu können, wurden sie mit Glycerol versetzt. Dazu wurde von der entsprechenden Bakterienkolonie eine Übernachtskultur angefertigt (Kap. 3.2.1.8). 800 µl der Übernachtskultur wurden mit 200 µl sterilem

Glycerol, die in einem autoklavierten Kryogefäß vorlegt worden waren, gemischt und 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Um die Bakterien wieder zum Leben zu erwecken, wurde mit einer sterilen Impföse etwas Bakterienmaterial aus dem Kryogefäß entnommen, ein Verdünnungsausstrich auf einer Antibiotika-haltigen LB-Agar-Platte angefertigt und die Platte über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.1.10 Sequenzierung von Nukleinsäuren

Die Sequenzierung von Nukleinsäuren (Cycle DNA Sequencing), die Bestimmung der Nukleotidabfolge innerhalb eines DNA-Moleküls, wurde in modifizierter Form nach der Kettenabbruchmethode von Sanger (1977) durchgeführt. Dabei wird die DNA zuerst in eine einzelsträngige Form, die Matrize, überführt. Diese Matrizen-DNA wird mit einem Oligonukleotid, dem Sequenzierungsprimer, hybridisiert. Ausgehend von diesem Primer erfolgt die enzymatische Synthese des zur Matrize komplementären Stranges.

Für die lineare Amplifizierung werden neben dem gereinigten PCR-Produkt und dem Sequenzierungsprimer BigDye-Terminatoren™ verwendet. Diese enthalten neben der DNA-Polymerase und den Desoxynukleosid-Triphosphaten (dNTP) auch fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleosid-Triphosphate (ddNTP), denen die Hydroxylgruppe am 3'-Kohlenstoffatom fehlt. Nach Bindung eines ddNTP an den Matrizenstrang kommt es zum Kettenabbruch, da aufgrund der fehlenden Hydroxylgruppe keine Phosphorsäurediesterbindung zu einem neu hinzukommenden Nukleotid ausgebildet werden kann.

Die Sequenzierungsreaktion wurde nach folgendem Schema in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße pipettiert:

dsDNA*	400-1000 ng
Primer (10 pmol)	1 μl
BigDye Premix	1 μl
ddH ₂ O	ad 10 μl

*Menge war abhängig von der Templatelänge: je länger, desto mehr Template wurde eingesetzt

Der Ansatz wurde in einen Thermozykler gestellt, und das folgende Programm wurde gestartet:

96°C	2 min 30 sec	
96°C	10 sec	} 25 x
55°C	5 sec	
60°C	4 min	
4°C	bis zur Weiterverarbeitung	

Nach der Sequenzierungsreaktion wurden die Proben durch Gelfiltration über Sephadex™ aufgereinigt, gefriergetrocknet und in Formamidlösung aufgenommen. Die Sequenzierung erfolgte in einem ABI PRISM™ 3100 Genetic Analyzer. Dieses Gerät bestimmt durch eine Vielfarbfluoreszenzmarkierung und Kapillarelektrophorese mit einem Trennmedium (Polymer) automatisch Größe, Sequenz und Menge einer Nukleinsäure. Nur die Fragmente, die an ihrem 3'-Ende ein ddNTP haben, tragen eine Farbmarkierung, die ein Laserstrahl, der das Gel abtastet, einzeln erfassen kann. Das Ergebnis der Sequenzierung wurde als Computerdatei erhalten und konnte mit Hilfe verschiedener Programme ausgewertet werden. Mit dem Programm Factura™ wurde der Abschnitt festgelegt, in dem die Sequenz gut zu lesen war. Das Programm AutoAssembler™ ermöglichte es, einzelne Sequenzen zu einem Ganzen, dem sogenannten *Assembly*, zusammensetzen. Um Sequenzen miteinander zu vergleichen oder Analysen der offenen Leserahmen durchzuführen, wurde das Programm MacVector™ genutzt.

3.2.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.2.1 Expression rekombinanter Proteine

Für die Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* kamen drei verschiedene Expressionssysteme zur Anwendung: das Echo™ Cloning System, der pTriEx-Multisystem-Vektor und das GST-Gene-Fusion-System. Vor Beginn der Expression wurden Vorkulturen angelegt (Kap. 3.2.1.8). Das Wachstum der Bakterienzellen wurde während der Expression anhand der optischen Dichte bei 588 nm (OD₅₈₈) im Photometer verfolgt. Die Expression wurde während der mittleren logarithmischen Wachstumsphase (OD₅₈₈ = 0,6) der Bakterienzellen mit Arabinose oder Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid (IPTG) induziert. Von Bakterienklonen, die das korrekte Protein exprimierten, wurde, soweit noch nicht geschehen, eine Glyceroldauerkultur (Kap. 3.2.1.9) angelegt.

3.2.2.1.1 Expression von His-Fusionsproteinen mit dem Echo™ Cloning System

Durch die Fusion von Insert-tragendem Donorvektor mit dem Akzeptorvektor (Kap. 3.2.1.7.2.1), der die für die Transkription notwendigen regulatorischen Elemente trägt, wurden die gB1- und gB2-Fragmente von PLHV-1 und PLHV-2 im Leserahmen mit einem C- und N-terminalen Fusionsprotein kloniert. Am C-Terminus kodiert der Vektor für Thioredoxin, einem 11,7 kDa großen Protein, das die Transkriptionseffizienz erhöht und in einigen Fällen auch die Löslichkeit exprimierter Proteine. Durch Austausch von zwei Aminosäuren (Position 32 und 64) besitzt das Thioredoxin eine Metall-Binde-Domäne. Am N-Terminus beinhaltet die Vektorsequenz ein V5-Epitop und einen Polyhistidinrest aus sechs Histidinen. Beide dienen der Detektion exprimierter Proteine im Western Blot, der Polyhistidinrest zusätzlich als Metall-Binde-Domäne. Weitere Elemente des Vektors sind eine Enterokinase-Erkennungsstelle zur Abspaltung des N-terminalen Thioredoxins und das *bla*-Gen für die Resistenzbildung gegenüber Ampicillin. Die Expression steht unter Kontrolle des durch Arabinose-induzierbaren *araBAD*-Promotors (pBAD).

Zur Expression wurde selektives LB-Medium (50 µg Kanamycin/ml) mit 1/20 Volumen einer Vorkultur einer rekombinanten *E. coli* Top10-Kolonie angeimpft. Zur Optimierung der Expressionsbedingungen erfolgte das Wachstum in einem Volumen von 10 ml in Nasenkolben unter Schütteln bei 200 rpm, wobei die Temperatur (30°C und 37°C), die Menge an Induktor (0,00002% bis 0,2% Arabinose) und die Dauer der Induktion (3-5 h) variiert wurden. Für jeden Ansatz wurde eine uninduzierte Kontrolle mitgeführt, um die Expressionsraten induzierter Zellen nach Beendigung der Expression mit der Expressionsrate uninduzierter Kontrollen im Coomassie-gefärbten Polyacrylamidgel (Kap. 3.2.2.7) und im Western Blot (Kap. 3.2.2.9) zu vergleichen. Dafür wurden 2 ml Aliquots zentrifugiert (13000 rpm, 10 min, 4°C, Heraeus) und Gesamtprotein sowie lösliches und unlösliches Protein aufgearbeitet (Kap. 3.2.2.2.3.1). Die Expression zur Gewinnung größerer Mengen rekombinanten Proteins wurde unter optimierten Bedingungen bei 37°C in einem Volumen von bis zu 500 ml in Glaskolben durchgeführt und 4 h nach Induktion mit 0,2% Arabinose abgeschlossen. Nach Beendigung der Induktion wurden die Bakterienkulturen zentrifugiert (8000 rpm, 20 min, 4°C, Sorvall) und die Bakterienzellpellets bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.2.1.2 Expression von GST-Fusionsproteinen mit dem GST-Gene-Fusion-System

Das GST-Gene-Fusion-System besteht aus drei verschiedenen Komponenten, die die Expression, Reinigung und Detektion von in *E. coli* exprimierten GST-Fusionsproteinen ermöglichen. Die gB1- und gB2-Fragmente von PLHV-1 und PLHV-3 wurden durch

Klonierung in den Vektor pGEX-6P-1 im Leserahmen mit der Glutathion S-Transferase (GST) und einer Protease kloniert, die N-terminal zu den inserierten Genen lagen. Die GST dient zum einen als Antikörper-Bindestelle, zum anderen lassen sich native GST-Fusionsproteine durch die enzymatische Aktivität der GST und Bindung an Glutathion Sepharose aufreinigen. Durch die Protease kann das GST von dem interessierenden Protein nach Expression enzymatisch abgespalten werden. Die Expression von GST-Fusionsproteinen unterliegt der Kontrolle eines durch IPTG-induzierbaren Promotors (ptac). In Verbindung mit dem *lacI^q*-Gen des Vektors kann, unabhängig vom verwendeten Bakterienstamm, die Expression durch Zugabe von IPTG induziert werden.

Zur Bestimmung der optimalen Expressionsbedingungen wurden je 10 ml selektives LB-Flüssigmedium (100 µg Ampicillin/ml + 34 µg Chloramphenicol/ml) mit 1/20 Volumen einer Vorkultur einer rekombinanten *E. coli* Rosetta™-Kolonie angeimpft. Das Wachstum der Zellen erfolgte bei unterschiedlichen Temperaturen (25°C, 30°C und 37°C) und verschiedenen Induktorkonzentrationen (0,1 M, 0,2 M und 0,5 M IPTG) auf einem Schüttler (200rpm). Für jeden Ansatz wurde eine uninduzierte Kontrolle mitgeführt, um die Expressionsraten induzierter Bakterienzellen nach Beendigung der Expression mit den Expressionsraten uninduzierter Kontrollen im Coomassie-gefärbten Polyacrylamidgel und im Western Blot zu vergleichen. Dafür wurden 2 ml Aliquots zentrifugiert und Gesamtprotein sowie lösliches und unlösliches Protein mittels BugBuster® Protein Extraction Reagent aufgearbeitet. Zur Gewinnung größerer Mengen rekombinanten Proteins wurde die Expression unter optimierten Bedingungen (37°C, 0,1 M IPTG, 2 h, 200 rpm) in einem Volumen von bis zu 500 ml in einem mit Schikanen versehenen Erlenmeyerkolben durchgeführt. Nach Beendigung der Induktion wurden die Bakterienkulturen in ausgewogene Zentrifugenbecher überführt, zentrifugiert (8000 rpm, 20 min, 4°C, Sorvall) und das Bakterienzellpellet bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.2.1.3 Expression von His-Fusionsproteinen mit dem pTriEx-Multisystem-Vektor

Der pTriEx-Multisystem-Vektor besitzt verschiedene Promotoren und ermöglicht dadurch die Expression C-terminaler Fusionsproteine in *E. coli* sowie in Mammalier- und Insektenzellen. In dieser Arbeit wurden rekombinante Proteine unter Kontrolle des IPTG-induzierbaren T7-Promotors prokaryot in Rosetta(DE3)pLacI-Zellen exprimiert. Die Gene bzw. Genbereiche von PLHV-1, -2 und -3 wurden dabei an ihrem N-Terminus im Leserahmen mit einem Polyhistidinrest aus acht Histidinen kloniert. Der Polyhistidinrest hat zwei Funktionen: zum einen können exprimierte Proteine durch

Bindung von anti-Histidin-Antikörper im Western Blot detektiert werden, zum anderen dient er als Metall-Binde-Domäne zur Aufreinigung exprimierter Proteine.

Zur Expression wurde Antibiotika-haltiges LB-Flüssigmedium (100 µg Ampicillin/ml + 34 µg Chloramphenicol/ml) mit 1/20 Volumen einer Vorkultur einer rekombinanten *E. coli* Rosetta (DE3)pLacI-Kolonie angeimpft. Nach Induktion mit 1 mM IPTG wurden die Bakterienkulturen für weitere zwei Stunden bei 37°C auf einem Schüttler (200 rpm) inkubiert. Nach Beendigung der Induktion wurden die Bakterienkulturen in ausgewogene Zentrifugenbecher überführt, zentrifugiert (8000 rpm, 20 min, 4°C, Sorvall) und die Bakterienzellpellets bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

3.2.2.2 Reinigung exprimierter Fusionsproteine

3.2.2.2.1 Reinigung über Bindung an Ni-NTA-Agarose

Rekombinante His-Fusionsproteine wurden nach Aufschluss des Bakterienzellpellets unter denaturierenden Bedingungen mit Ni-NTA-Agarose inkubiert und über mehrere Waschschriffe von bakteriellen Kontaminationen befreit. Dazu wurden die bei –20°C gelagerten Bakterienzellpellets für 15 min auf Eis aufgetaut, mit Puffer A resuspendiert (5 ml je g Feuchtgewicht) und für 60 min auf einem Rotator inkubiert. Der Überstand wurde nach Zentrifugation (13000 rpm, 30 min, RT, Sorvall) mit Ni-NTA-Agarose gemischt (1 ml Ni-NTA-Agarose pro 4 ml Lysat) und für 60 min auf einem Rotator inkubiert. Die Suspension aus Lysat und Ni-NTA-Agarose wurde in Polypropylen-Säulen gegeben und das Protein, nach zweimaligen Waschen mit jeweils 4 ml Puffer C, eluiert. Für die Elution wurde die Säule 4x mit 0,5 ml Puffer D und 4x mit 0,5 ml Puffer E gewaschen. Für die Analyse in der SDS-PAGE (Kap. 3.2.2.7) wurden jeweils 20 µl Aliquots vor der Inkubation mit Ni-NTA-Agarose und nach jedem Wasch- und Elutionsschritt entnommen.

3.2.2.2.2 Reinigung über Bindung an Glutathion Sepharose 4B

GST-Fusionsproteine wurden durch Verwendung des “*GST Purification Module*” des GST-Gene-Fusion-Systems nach Aufreinigung und Lysierung der “*inclusion bodies*” (Kap. 3.2.2.2.3; Kap. 3.2.2.3) und Konzentrierung und Renaturierung der Proteinlösung (Kap. 3.2.2.5; Kap. 3.2.2.4) durch Bindung an Glutathion Sepharose 4B von restlichen Bakterienbestandteilen getrennt. Dazu wurden die an Sepharose gebundenen Proteine mehrmals gewaschen und Kontaminationen, die sich nach Zentrifugation im Überstand befanden, entfernt.

Vor Inkubation mit den GST-Fusionsproteinen musste die Sepharose, die als 75%ige alkoholische Lösung vorlag, vorbereitet werden. Dazu wurde die erforderliche Menge an 75%iger Sepharose entnommen, in ein Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert

(500g, 5 min, 4°C, Heraeus). Der Überstand wurde entfernt und die Sepharose zweimal mit 4°C-kaltem PBS gewaschen und zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde die Sepharose in PBS aufgenommen, mit der renaturierten und konzentrierten Proteinlösung gemischt und für 30 min auf einem Rotator bei RT inkubiert. Nicht gebundene Bestandteile wurden durch Zentrifugation entfernt. Das an Sepharose gebundene Protein wurde zur Entfernung von nichtgebundenen Bestandteilen dreimal mit PBS gewaschen und zentrifugiert. Der Überstand mit den ungebundenen Proteinen wurde nach jedem Waschschrift entfernt. Die Elution der Proteine erfolgte durch dreimalige Inkubation mit Glutathion-Elutionspuffer für 10 min bei RT. Durch Zentrifugation wurde das im Überstand befindliche Protein nach jedem Elutionsschritt gewonnen. Nach jedem Waschschrift wurden 20 µl Aliquots des Überstandes abgenommen und gemeinsam mit einem Aliquot des eluierten Proteins in der SDS-PAGE analysiert (Kap. 3.2.2.7).

3.2.2.2.3 Reinigung mit BugBuster® Protein Extraction Reagent

Rekombinante Fusionsproteine wurden mit dem BugBuster® Protein Extraction Reagent, einer Mischung aus nicht-ionischen Detergenzien, unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt. Für die Degradierung von DNA und RNA wurde zusätzlich Benzonase Nuklease zugesetzt. Die Effizienz der Proteinextraktion wurde durch Zugabe von rLysozym™ Solution erhöht. Zur Untersuchung der Expressionsrate und der Löslichkeit exprimierter Proteine wurden nach der Expression Aliquots entnommen und aufgereinigt. Darauf erfolgte erst die Aufreinigung der Gesamtkultur.

3.2.2.2.3.1 Aufreinigung von Aliquots heterologer Proteine

Die Bakterienzellpellets von 2 ml Aliquots wurden mit jeweils 100 µl Extraktionsreagenz resuspendiert. Die Suspension wurde mit 1 µl Benzonase Nuklease (= 25 Units) gemischt und für 20 min auf einem Rotator inkubiert. Von der Suspension wurde ein 20 µl Aliquot für die Bestimmung des Gesamtproteins in der SDS-PAGE (Kap. 3.2.2.7) entnommen. Die restliche Suspension wurde zentrifugiert (13000 rpm, 5 min, 4°C, Heraeus). Vom Überstand mit den löslichen Bestandteilen und von dem mit 100 µl Extraktionsreagenz resuspendierten Pellet mit den unlöslichen Bestandteilen wurde jeweils ein 20 µl Aliquot für die Analyse in der SDS-PAGE entnommen.

3.2.2.2.3.2 Anreicherung und Reinigung von "inclusion bodies" aus der Gesamtkultur

Zur Anreicherung und Reinigung von "inclusion bodies" aus der Gesamtkultur mit BugBuster® Protein Extraction Reagent wurde die Masse des Bakterienzellpellets nach der Expression bestimmt und anschließend mit dem Extraktionsreagenz resuspendiert.

Je g Feuchtgewicht wurden 5 ml Extraktionsreagenz verwendet. Der Suspension wurden je ml 1 µl Benzonase Nuklease und 1 kU rLysozyme™ Solution zugesetzt. Die Suspension wurde für 20 min auf einem Rotator inkubiert. Zur Trennung von löslichen und unlöslichen Zellbestandteilen wurde die Suspension in ein ausgewogenes Zentrifugenröhrchen gegeben und zentrifugiert (12000 rpm, 20 min, 4°C, Sorvall). Der Überstand mit löslichen Bestandteilen wurde verworfen, das Pellet aus unlöslichen Komponenten wurde mit dem gleichen Volumen Extraktionsreagenz resuspendiert, das für die Resuspension des Bakterienzellpellets verwendet worden war. Die Suspension wurde nach Zugabe von 1 kU/ml rLysozyme™ Solution gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von sechs Volumen Extraktionsreagenz (1:10 verdünnt mit ddH₂O) wurde der Ansatz für 1 min gevortext. Zur Trennung der "*inclusion bodies*" von restlichen Zellbestandteilen wurde die Suspension zentrifugiert (6000 rpm, 15 min, 4 °C, Sorvall). Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet mit den "*inclusion bodies*" wurde in dem gleichen Volumen von 1:10 verdünntem Extraktionreagenz resuspendiert, gevortext und wieder zentrifugiert. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Danach wurden die "*inclusion bodies*" ein letztes Mal resuspendiert und zentrifugiert (12000 rpm, 15 min, 4°C, Sorvall). Der Überstand wurde wiederum verworfen und das Feuchtgewicht der pelletierten "*inclusion bodies*" bestimmt. Die angereicherten und von löslichen Proteinen und Zellbestandteilen gereinigten "*inclusion bodies*" wurden bis zur Lysierung (Kap. 3.2.2.3) bei -20°C gelagert.

3.2.2.3 Lysierung von "*inclusion bodies*"

Für die Lysierung angereicherter und gereinigter "*inclusion bodies*" wurde der Protein Refolding Kit verwendet. Die "*inclusion bodies*" wurden mit dem im Kit enthaltenen Lysispuffer (500 mM CAPS + 0.3% N-Laurosylysarkosin + 1 mM DTT, pH 11) resuspendiert, und zwar so, dass die Suspension eine Endkonzentration an "*inclusion bodies*" von etwa 20 mg/ml hatte. Die Suspension wurde für 15 min auf einem Rotator bei RT inkubiert und anschließend zentrifugiert (10000 rpm, 10 min, RT, Sorvall). Der Überstand mit dem gelösten Protein wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und entweder direkt über Zentrifugation konzentriert (Kap. 3.2.2.5).

3.2.2.4 Renaturierung von GST-Fusionsproteinen

Nach Lysierung und Konzentrierung der "*inclusion bodies*" wurden GST-Fusionsproteine mit dem Protein Refolding Kit renaturiert. Dazu wurde das Lysat in einen Dialyseschlauch gegeben und mit 1x Dialysepuffer mit 0.1 mM DTT (1x 3h und 1x 12h) und anschließend mit 1x Dialysepuffer ohne DTT (2x 3h) bei 4°C auf einem

Magnetrührer dialysiert. Jeder Dialyseschritt erfolgte mit dem 50-fachen Lysat-Volumen an frisch hergestelltem 1x Dialysepuffer. Nach der Dialyse wurde ausgefallenes Material durch Zentrifugation (13000 rpm, 10 min, 4°C, Sorvall) entfernt.

3.2.2.5 Konzentrierung von Proteinlösungen

Da das gelöste, rekombinante Protein nach dem Lysieren der "*inclusion bodies*" in einem großen Flüssigkeitsvolumen vorlag, wurde eine Konzentrierung der Proteinlösung vorgenommen. Eine geeignete Methode für eine schnelle Konzentrierung von Proteinlösungen ist die Ultrafiltration durch Zentrifugation. Dabei wird die Proteinlösung durch eine asymmetrische Zellulosemembran mit verschiedenen großen Poren an der Unter- und Oberseite und verschiedenen Ausschlussgrenzen filtriert. Das gewünschte Protein wird durch die Wahl einer geeigneten Porengröße aufgrund seines größeren Molekulargewichts retardiert, während Salze und andere Moleküle mit Molekulargewichten unterhalb der Ausschlussgrenze gemeinsam mit dem Wasser durch die Membran gepresst werden.

Für die Konzentrierung von Proteinen wurden Microcon YM 10 Zentrifugenröhrchen verwendet. Die Ausschlussgrenze dieser Röhrchen beträgt >10 kDa, das heißt, Proteine mit einem Molekulargewicht über 10 kDa werden zurückgehalten. Von der Proteinlösung wurden 500 µl in das Probenreservoir pipettiert und zentrifugiert (13000 rpm, 30 min, 25°C, Heraeus). Der Durchfluss wurde verworfen, und das im Probenreservoir retardierte und aufkonzentrierte Protein wurde durch Zentrifugation (3000 rpm, 3 min, 25°C, Heraeus) in ein Auffanggefäß überführt. Diese beiden Schritte wurden so oft wiederholt, bis die gesamte Proteinlösung konzentriert war. Anschließend wurde durch Analyse eines 20 µl Aliquots die Proteinkonzentration in der SDS-PAGE abgeschätzt (Kap. 3.2.2.6).

3.2.2.6 Konzentrationsabschätzung von Proteinen

Für Immunisierungsversuche sowie für Untersuchungen im Western Blot und im ELISA war es erforderlich, die Proteinkonzentration annäherungsweise zu bestimmen. Dafür wurden verschiedene Verdünnungen der gereinigten und aufkonzentrierten Proteinlösung in der SDS-PAGE analysiert (Kap. 3.2.2.7). Nach Coomassie-Blau-Färbung (Kap. 3.2.2.8) wurde die Proteinbande der Probe mit den Banden einer BSA-Eichkurve (1-5 µg/µl) verglichen und die Proteinkonzentration abgeschätzt.

3.2.2.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch vertikale Plattenelektrophorese wurden Proteine nach der Methode von Laemmli (1970) in 10%igen diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen analysiert. Dabei überschichtet ein großporiges Sammelgel ein kleinporiges Trenngel. Als Elektrophorese-

puffer wird ein Tris-Glycin-Puffer verwendet. Die Proteine wandern zwischen den schneller wandernden Chlorid-Ionen des Sammelgelpuffers und den langsamer wandernden Glycin-Ionen des Elektrophoresepuffers und werden dadurch in engen Banden im Sammelgel fokussiert. Beim Einwandern der Proben in das Trenngel, das eine geringere Porenweite, eine höhere Salzkonzentration sowie einen höheren pH-Wert im Vergleich zum Sammelgel besitzt, wandern die Glycin-Ionen an der Front, und die Proteine werden aufgrund ihrer molekularen Größe getrennt. Mit Hilfe von Markerproteinen konnten die Molekulargewichte der zu analysierenden Proteine ermittelt werden. Nach Auftrennung der Proteine wurden die Gele mit Coomassie-Blau gefärbt (Kap. 3.2.2.8) oder durch Elektrotransfer auf eine Polyvinylidenfluorid-(PVDF) Membran (Immobilon™-P Transfer Membran) übertragen (Kap. 3.2.2.9).

3.2.2.7.1 Herstellung von Polyacrylamidgelen

Zur Herstellung des kompletten Gelsystems (Tabelle 15) wurde zunächst das Trenngel zwischen einer mit Alkohol gereinigten Glas- und einer ebenfalls mit Alkohol gesäuberten Aluminiumplatte, die in einer Gelgießapparatur eingespannt waren, gegossen. Zur Ausbildung einer glatten Oberfläche wurde das Trenngel mit H₂O gesättigtem n-Butanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation des Trenngels wurde das n-Butanol gründlich mit ddH₂O entfernt und das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet. Geeignete Taschen zur Aufnahme der Proben wurden durch Einsetzen eines Elektrophoresekammes in die noch flüssige Sammelgellösung geschaffen. Für Proteinanalysen wurde ein mehrzinkiger, 0,75 mm dicker Kamm gewählt, während für präparative Zwecke ein einzinkiger, 1,5 mm dicker Kamm verwendet wurde. Nach Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm entfernt, und die Taschen wurden gründlich mit ddH₂O gespült. Das Gel wurde in eine vertikale Elektrophoresekammer eingesetzt, die anschließend mit Elektrophoresepuffer gefüllt wurde.

Tabelle 15: Pipettierschema für Trenngel und Sammelgel

Komponenten	Trenngel (10%)	Sammelgel (5%)
Acrylamid/Bis (37,5% w/v)	10 ml	3,3 ml
Trenngelpuffer	7,5 ml	-
Sammelgelpuffer	-	2,5 ml
H ₂ O	11,9 ml	13,7 ml
SDS (10% w/v)	0,3 ml	0,2 ml
Ammoniumpersulfat (10% w/v)	0,12 ml	0,12 ml
TEMED	0,04 ml	0,04 ml

3.2.2.7.2 Probenvorbereitung

Die rekombinanten Proteine wurden bei der Probenvorbereitung in 2x SDS-Probenpuffer hitzedenaturiert. Durch den Zusatz des anionischen Detergenz SDS wurde die Eigenladung der Proteine so effektiv überdeckt, dass anionische Mizellen mit konstanter Nettoladung pro Masseneinheit entstanden (circa 1,4 g SDS pro g Protein), wodurch die Proteine Richtung Anode wanderten. Das im Probenpuffer enthaltene β -Mercaptoethanol, ein niedermolekulares Thiol, bewirkte eine Reduzierung von Disulfidbrücken in den Proteinen.

Zur Vorbereitung wurden die Proben 1:2 mit 2x SDS-Probenpuffer verdünnt, für 5 min bei 100°C im Wasserbad inkubiert und anschließend zentrifugiert (13000 rpm, 5 min, 4°C, Heraeus).

Zum Nachweis viraler Proteine in Aliquots eukaryoter Zellen wurden nach Bestimmung der Lebendzellzahl (Kap. 3.2.4.2.2) die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde die Zellsuspension zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet mit etwa $0.5-2 \times 10^7$ Zellen wurde mit 1 ml 2xSDS-Probenpuffer resuspendiert und für 5 min bei 100°C im Wasserbad inkubiert. Zur Verringerung der Viskosität wurde die Zellsuspension anschließend 5x10 sec mit Ultraschall behandelt. Unlösliches Material wurde durch Zentrifugation (13000 rpm, 5 min, 4°C, Heraeus) entfernt.

3.2.2.7.3 Probenauftrag und Gelelektrophorese

Für analytische Zwecke (Kontrolle der Expressionsrate, Konzentrationsabschätzung) wurden 10 μ l der vorbereiteten Probe mittels einer Mikroliterpipette in eine Geltasche pipettiert. Für die Untersuchung von Seren im Western Blot wurde jeweils 1 μ g Protein aufgetragen. Zur Präparation von Proteinen für die Immunisierung von Mäusen und

Kaninchen (Kap. 3.2.3.1) wurden Aliquots zu je 20 µg und 100 µg Protein auf ein präparatives Gel aufgetragen. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurden parallel zu den Proben 5-10 µl eines Proteinstandards aufgetragen.

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei einem konstantem Stromfluss von 20 mA pro Gel. Nachdem das Bromphenolblau des 2x SDS-Probenpuffers das Gel durchwandert hatte, wurde die Elektrophorese gestoppt, das Gel zwischen den Platten entfernt und in eine Coomassie-Blau-Färbelösung gelegt (Kap. 3.2.2.8) oder in Transferpuffer äquilibriert und geblottet (Kap. 3.2.2.9).

3.2.2.8 Coomassie-Blau-Färbung

Die irreversible Färbung und Fixierung von Proteinen im Polyacrylamidgel erfolgte durch Färbung mit Roti®-Blue. Dabei handelt es sich um eine 5-fach konzentrierte, kolloidale Coomassie Brilliant Blau G-250 Lösung. Zur Herstellung der 1x Gebrauchslösung wurden 60 ml Wasser mit 20 ml Methanol und 20 ml 5-fach Färbelösung gemischt. Die Gele wurden nach der Elektrophorese in die Färbelösung gelegt und über Nacht gefärbt. Zur Entfernung unspezifischer Anfärbungen mit Coomassie-Blau wurden die Gele für mehrere Stunden in Coomassie-Blau-Entfärbelösung inkubiert. Die Nachweisgrenze für die Färbung mit Coomassie-Blau liegt im Bereich von 0,1-2 µg Protein pro Bande.

3.2.2.9 Western Blot

Beim Western Blot werden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine durch Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran übertragen und für die nachfolgende Immundetektion (Kap. 3.2.2.11) immobilisiert. Als Blotkammer wurde eine Halbtrockenzelle von Bio-Rad mit Platin/Edelstahl-Elektroden verwendet (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell).

Zur Vorbereitung des Transfers wurden die Gele nach der SDS-PAGE in Transferpuffer äquilibriert. Die PVDF-Membran und das Filterpapier wurden entsprechend der Gelgröße zurechtgeschnitten. Die Membran wurde mit Methanol p.A. befeuchtet, kurz mit ddH₂O gewaschen und gemeinsam mit dem Filterpapier in den Transferpuffer gelegt. Der Aufbau für den Elektrotransfer ist schematisch in Abb. 5 dargestellt. Je ccm Gelfläche wurden 3 mA Strom angelegt. Geblottet wurde für 50 min.

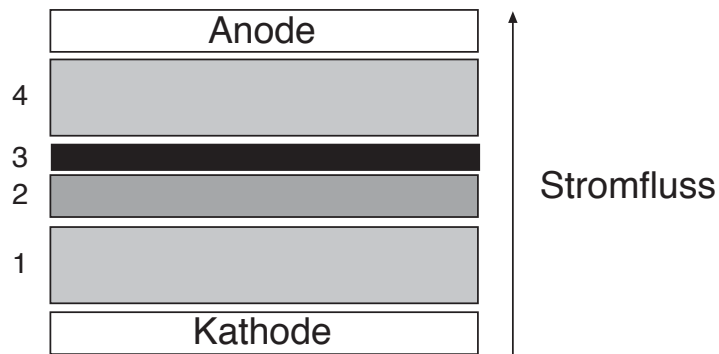


Abb. 5: Western-Blot-Aufbau

In der Abbildung ist der Aufbau eines Western Blot schematisch dargestellt. Die Kathode wird mit einem in Transferpuffer getränktem Filterpapier bedeckt (1). Auf das Filterpapier wird das Polyacrylamidgel mit den aufgetrennten Proteinen gelegt (2) und mit der PVDF-Membran (3) bedeckt. Als nächste und letzte Schicht folgt noch einmal ein feuchtes Filterpapier (4). Der Pfeil kennzeichnet den Stromfluß.

3.2.2.10 Färbung membrangebundener Proteine

Nach dem Western Blot wurden die Proteine durch reversible oder irreversible Färbung der PVDF-Membran dargestellt. Zur Kontrolle eines erfolgreichen Proteintransfers wurde die PVDF-Membran reversibel mit Ponceaurot gefärbt. Durch Ponceaurot werden alle auf die Membran transferierten Proteine angefärbt. Detektiert werden Proteine mit einer Bandenstärke von >50 ng. Durch Spülen unter fließendem Wasser wurde überflüssiger Farbstoff entfernt. Zur irreversiblen Färbung transferierter Markerproteine wurde die Membran mit Amidoschwarz-Lösung gefärbt. Die Entfernung von unspezifisch gebundenem Amidoschwarz erfolgte durch Spülen der Membran mit Amidoschwarz-Entfärbelösung. Nach dem Entfärben wurden die Membranen an der Luft getrocknet und bis zur weiteren Verwendung trocken und dunkel aufbewahrt.

3.2.2.11 Immunologischer Nachweis membrangebundener Proteine

Proteine können nach Immobilisierung an Membranen durch eine Antikörpervermittelte Enzymreaktion nachgewiesen werden. In einem ersten Schritt erfolgt die Bindung eines spezifischen Antikörpers an das immobilisierte Zielprotein (= Antigen). Die Visualisierung dieses Antigen-Antikörper-Komplexes erfolgt mit einem Enzymgekoppelten anti-Spezies-IgG-Antikörper und Zugabe eines Substrat-Chromogen-Gemisches.

Vor der Immundetektion wurde die getrocknete Membran mit Methanol p.A. befeuchtet und anschließend kurz mit ddH₂O gespült. Das Markerprotein wurde abgetrennt und irreversibel mit Amidoschwarz gefärbt (Kap. 3.2.2.10). Nach Bedarf wurde die restliche Membran in unterschiedlich breite Streifen geschnitten, so dass mehrere verschiedene Proben (Serum oder monoklonale Antikörper) parallel untersucht werden konnten. Die Membran bzw. Membranstreifen mit den rekombinanten Proteinen wurde zum

Absättigen unspezifischer Proteinbindungsstellen für 1 h mit Blockpuffer unter leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit dem primären Antikörper für 1 h bei RT inkubiert. Dazu wurden die Mäuseseren 1:100 und die Seren von Schweinen und Menschen sowie die Hybridomaüberstände 1:50 mit Blockpuffer verdünnt. Die monoklonalen Antikörper Maus-anti-His und Ziege-anti-GST wurden in einer Verdünnung von 1:2500 verwendet. Nach Bindung des ersten Antikörpers wurde die Membran 3x 10 min mit Waschpuffer gewaschen und nachfolgend 1 h mit dem in Blockpuffer verdünnten, an alkalischer Phosphatase gekoppelten Zweitantikörper inkubiert. Die Sekundärantikörper anti-Maus-IgG und anti-Kaninchen-IgG wurden 1:2500 mit Blockpuffer verdünnt. Alle anderen Konjugate wurde in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Die Membran wurde erneut 3x für jeweils 10 min gewaschen. Zur Äquilibrierung wurde die Membran einmal 5 min mit AP-Detektionspuffer gewaschen. Eine Substrattablette mit 2 mg Naphthol-AS-Phosphat und 1 mg Fast Red (Multicolor Detection Set) wurde in 10 ml AP-Detektionspuffer gelöst und die Membran in diese Färbelösung gelegt. Die Farbreaktion wurde nach 1-2 min durch Waschen mit ddH₂O gestoppt und die Membran an der Luft getrocknet.

3.2.3 Tierexperimentelle Arbeiten

3.2.3.1 Gewinnung polyklonaler Antiseren für Western-Blot- und ELISA-Analysen

Für die Immunisierung von Mäusen und Kaninchen wurden heterologe Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert. Nach Anreicherung, Aufreinigung und Lysierung der "inclusion bodies", Konzentrierung der Proteinlösung und Abschätzung der Proteinkonzentration in der SDS-PAGE wurden Aliquots zu je 20 µg und 100 µg Protein auf ein präparatives Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach der SDS-PAGE und Coomassie-Blau-Färbung wurden die Proteinbanden mittels Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten, die Protein-Gel-Fragmente fein zerkleinert und in 100 µl bzw. 500 µl PBS aufgenommen. Die Antigenapplikation erfolgte bei den Mäusen intraperitoneal in das untere Drittel des Abdomens (20 µg Antigen in 100 µl PBS). Den Kaninchen wurden mit jeder Applikation 100 µg Antigen, gelöst in 500 µl PBS, subkutan in die Flanke verabreicht. Nach der Grundimmunisierung an Tag 1 erfolgten drei Boosterinjektionen, deren Zeitpunkte ebenso wie die Zeitpunkte der Blutentnahmen zur Kontrolle der Antikörperbildung in Tabelle 16 dargestellt sind. Bei der Maus erfolgten die Blutentnahmen aus der Schwanzvene unter Ether-Narkose oder aus dem retroorbitalen Venenplexus unter Halothan-Narkose. Bei den Kaninchen wurde Blut aus der lateralen Ohrvene entnommen. Vor der ersten Immunisierung wurde zu Kontrollzwecken Prä-Immunsrum (= Negativserum, NS) gewonnen. Die

Tötung der Tiere an Tag 85 nach Grundimmunisierung erfolgte durch Entbluten unter Ether- oder Halothan-Narkose.

Tabelle 16: Immunisierungs- und Blutentnahmezeitpunkte bei Mäusen und Kaninchen

Tag	1	14	28	39	56	67	85
Immunisierung	x	x	x		x		
Blutentnahme	x			x		x	x

3.2.3.2 Serumaufarbeitung

Zur Serumaufarbeitung wurden die Blutproben nach der Entnahme bis zur Gerinnung bei RT stehengelassen. Das geronnene Blut wurde über Nacht bei 4°C aufbewahrt und zur Gewinnung des Serums zentrifugiert (13000 rpm, 10 min, 4°C, Heraeus). Das Serum wurde mittels einer Pipette abgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet aus Erythrozyten wurde verworfen. Die Serumproben der Mäuse, die mit dem gleichen Antigen immunisiert worden waren, wurden zu jedem Entnahmezeitpunkt gepoolt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

3.2.3.3 Adsorption unspezifischer Bindungsstellen polyklonaler Antiseren

Die durch Immunisierung von Mäusen und Kaninchen gewonnenen polyklonalen Antiseren wurden zur Erhöhung ihrer Spezifität mit Gesamtprotein aus *E. coli* adsorbiert. Das zur Adsorption unspezifischer Bindungsstellen eingesetzte Zellmaterial wurde zuvor mit Aceton gefällt. Dafür wurden bis zu 0,5 g Zellmaterial mit 1 ml PBS resuspendiert und mit dem fünffachen Volumen an -20°C-kaltem Aceton versetzt. Nach Inkubation für 20 min auf Eis wurde gefälltes Protein pelletiert (13000 rpm, 20 min, 4°C, Heraeus). Das Pellet wurde mit dem gleichen Volumen -20°C-kaltem Aceton resuspendiert, erneut auf Eis inkubiert und abzentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde gefälltes Protein auf Filterpapier ausgebreitet, an der Luft getrocknet und nach dem Trocknen in einem Handmörser fein zermahlen. Das so gewonnene "*E. coli*-Proteinpuder" wurde zur Adsorption unspezifischer Bindungsstellen eingesetzt. Das Serum wurde dazu mit 10% (w/v) "*E. coli*-Proteinpuder" versetzt und unter leichtem Schütteln für 2 h bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation (13000 rpm, 5 min, 4°C, Heraeus) wurde das adsorbierte Serum abgenommen.

3.2.4 Immunologische Methoden

3.2.4.1 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Die Durchführung eines ELISA wurde erstmals durch Engvall und Perlmann zur quantitativen Bestimmung von Antigenen (1971) bzw. von Antikörpern (1972) beschrieben. Dabei handelt es sich um einen Enzymimmunoassay (EIA), mit dessen Hilfe geringste Mengen an Antigen oder Antikörper nachgewiesen werden können. Dabei kommt es zu einer Wechselwirkung zwischen Antigen und Antikörper, die durch eine Enzym-katalysierte Chromogenumwandlung sichtbar gemacht wird. Das lösliche und farblose Chromogen wird dabei zu einem löslichen und gefärbten Farbstoff umgesetzt, der sich durch Messung mit dem Photometer quantifizieren lässt. Alle Reaktionen des ELISA finden mit einem immobilisierten Partner statt, was die Trennung von gebundenen und nicht gebundenen Reagenzien erheblich erleichtert. Der in dieser Arbeit zur Anwendung gekommene ELISA wurde als sogenannter indirekter ELISA in 96-Loch-Mikrotiterplatten aus Plastik durchgeführt. Dabei wurde das Antigen an die feste Phase gebunden und die zu untersuchende Probe (Blut- oder Milchserum, monoklonale Antikörper) mit dem fixierten Antigen inkubiert. Fand zwischen dem Antigen auf der Platte und der Probe eine Bindung statt, wurde die Probe ebenfalls an die Platte gebunden. Diese Reaktion wurde durch Inkubation mit einem Enzym-gebundenen Sekundärantikörper, dem Konjugat, nachgewiesen. Nach Substratzugabe katalysierte das am Sekundärantikörper gekoppelte Enzym (hier Alkalische Phosphatase = AP) die mit einem Farbumschlag des farblosen Substrates verbundene Reaktion, die in einem Photometer quantifiziert wurde.

Als Festphase wurden mit einer Ni-NTA-Matrix beschichtete Mikrotiterplatten (Ni-NTA HisSorb™ Plates) verwendet. Dabei wurde das Antigen über Wechselwirkung zwischen dem Nickelkation der Ni-NTA-Matrix und seinem Histidin-Tag an die Platte gebunden.

3.2.4.1.1 Optimierungsversuche

Zur Bestimmung der optimalen Antigenmenge zur Beschichtung von 96-Loch-Mikrotiterplatten sowie zur Ermittlung der geeigneten Verdünnungen von Antiserum (Negativ- und Positivserum) und Konjugat, wurden alle drei Komponenten durch Schachbrett-Verdünnung (Abb. 6) gegeneinander titriert (Crowther, 2001). Mittels Schachbrett-Verdünnung können maximal zwei Reagenzien gegeneinander austitriert werden. Dabei werden die Reagenzien in verschiedenen Richtungen und bei Bedarf über die gesamte Platte in beliebigen Verdünnungsschritten verdünnt. Im ersten Schritt wird ein Reagenz von Säule 1–11 verdünnt. Nach Inkubation und Entfernung des ersten Reagenz wird das zweite Reagenz von Reihe A–G verdünnt. In Säule 12 und

Reihe H wird nur Verdünnungspuffer pipettiert (Kontrollen). Durch diese Art der Verdünnung kann diejenige Kombination der gegeneinander titrierten Reagenzien bestimmt werden, bei der die höchste Extinktion bei gleichzeitig geringer Hintergrundfärbung gemessen wird.

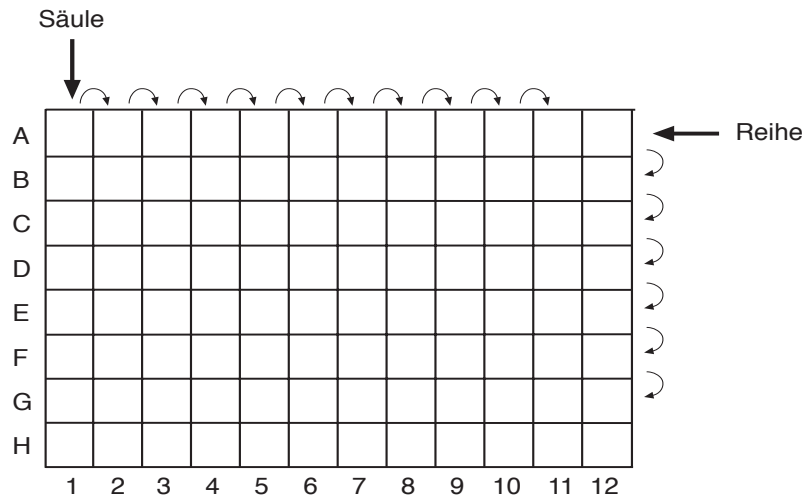


Abb. 6: Schachbrett-Verdünnung

Die Abbildung zeigt eine 96-Loch-Mikrotiterplatte. Die waagrecht nebeneinander liegenden zwölf Vertiefungen werden als Reihe mit den Buchstaben A bis H bezeichnet. Die acht übereinander liegenden Vertiefungen werden zu Säulen zusammengefasst, die von 1 bis 12 durchnummeriert werden. Ein Reagenz wird von Säule 1 bis 11 verdünnt, das andere von Reihe A bis G. Die Verdünnungsrichtung ist durch die Pfeile gekennzeichnet. Zur Durchführung von Kontrollen beinhalten Säule 12 und Reihe H keine Verdünnung der Reagenzien.

Um unspezifische Reaktionen festzustellen, wurden bei den Vorversuchen verschiedene Kontrollen mitgeführt:

1. Antigen-Kontrolle: Vertiefung ohne Serum
2. Serum-Kontrolle: Vertiefung ohne Antigen
3. Konjugat-Kontrolle: Vertiefung ohne Antigen und ohne Serum
4. Substrat-Kontrolle: Vertiefungen ohne Antigen, ohne Serum und ohne Konjugat

3.2.4.1.1.1 Titration von Antigen und Antiserum

Das Antigen wurde in Verdünnungsschritten von 1:2 verdünnt. Dazu wurde in die Vertiefungen einer 96-Loch-Ni-NTA-HisSorb-Mikrotiterplatte 50 µl Probenverdünnungspuffer pipettiert. Die Säulen 9-12 blieben leer. Von einer Stammlösung (25 µg/ml) des in *E.coli* exprimierten Antigens PLHV-1-gB1-His wurden 50 µl in die acht Vertiefungen der ersten Säule pipettiert. Nach Mischen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurden mittels einer 8-Kanal-Mehrfachpipette jeweils 50 µl von der ersten Säule in die zweite Säule pipettiert. Nach Mischen mit dem in dieser Säule vorgelegten

Verdünnungspuffer wurden wiederum 50 µl einer jeden Vertiefung in die acht Vertiefungen der dritten Säule pipettiert. Nach diesem Schema wurde das Antigen in Verdünnungsschritten von 1:2 bis zur sechsten Säule weiter verdünnt. Aus dieser Säule wurden 50 µl je Vertiefung verworfen. In Säule 7 und 8 wurde kein Antigen pipettiert. Diese Säulen dienten für die Serum-Kontrolle (Säule 7) und Substrat-Kontrolle (Säule 8). Nach Inkubation bei 4°C über Nacht und 3x fünfminütigem Waschen mit Waschpuffer (PBST) wurden unspezifische Bindungsstellen durch Zugabe von 200 µl Blockpuffer je Vertiefung und 60-minütiger Inkubation bei 37°C abgesättigt. Der Blockpuffer wurde durch Ausschütten und Ausklopfen der mit der Oberseite nach unten gekehrten Platte auf ein sauberes Tuch entfernt. Das vor bzw. nach der Immunisierung von Mäusen gewonnene Negativserum (NS) bzw. Positivserum (PS) wurde in ähnlicher Weise über die Platte verdünnt wie das Antigen. Dazu wurden 50 µl Probenverdünnungspuffer in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Reihe A und B und die Säulen 11-12 wurden ausgespart. Anschließend wurden 50 µl einer 1:10 Verdünnung in die ersten sieben Vertiefungen von Reihe A pipettiert und 100 µl einer 1:50 Verdünnung in die ersten sieben Vertiefungen von Reihe B. 50 µl der 1:50 Verdünnung wurden mit einer Mehrkanalpipette in die Vertiefungen von Reihe C pipettiert, mit dem vorgelegten Verdünnungspuffer gemischt und 50 µl der Verdünnung in Reihe D überführt. So wurde fortgefahren bis zu Reihe G. Von den Vertiefungen dieser Reihe wurden jeweils 50 µl verworfen. In Reihe H wurde nur Verdünnungspuffer pipettiert (= Antigen-Kontrolle). Nach Inkubation von 2 h bei 37°C wurden die Platten 3x mit PBST gewaschen, restlicher Waschpuffer durch Ausschütten und Ausklopfen entfernt und 50 µl des AP-konjugierten, Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörpers (1:1000 verdünnt) in die Vertiefungen gegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. In Säule 8 wurde nur Verdünnungspuffer gegeben (= Substrat-Kontrolle). Die Konjugat-Kontrolle erfolgte in den Vertiefungen H8 und H9. Die Platten wurden erneut 3x mit PBST und zur Äquilibration einmal mit Substratpuffer gewaschen. Die erforderliche Anzahl an p-Dinitrophenylphosphat-Substrattabletten wurden in Substratpuffer gelöst (5 ml pro Tablette) und in die Vertiefungen je 50 µl der Substratlösung pipettiert. Die Platten wurden für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und nach Stoppen der Reaktion mit NaOH (2 mol/l) im Multiskan Plus bei einer Wellenlänge von 405 nm ausgewertet.

3.2.4.1.1.2 Titration von Antiserum und Konjugat

Die Vertiefungen einer Ni-NTA-HisSorb-Mikrotiterplatte wurden, bis auf Säule 12 (= Konjugat-Kontrolle), mit jeweils 50 µl Antigen (= 1,25 µg PLHV-1-gB1-His) beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligen Waschen mit

Waschpuffer (5 min je Waschvorgang) wurde in jede Vertiefung 50 µl Probenverdünnungspuffer pipettiert. Von einer 1:25 Verdünnung des NS bzw. des PS wurden 50 µl in die acht Vertiefungen der ersten Säule pipettiert, mit dem vorgelegten Verdünnungspuffer gemischt und 50 µl aus jeder Vertiefung in die Vertiefungen der zweiten Säule überführt. Nach Mischen wurden wiederum 50 µl entnommen und mit dem in Säule 3 vorgelegten Verdünnungspuffer gemischt. Nach diesem Schema wurde das Serum in Verdünnungsschritten von 1:2 bis zu Säule 11 weiter verdünnt. Von den Vertiefungen dieser Säule wurden 50 µl verworfen. Säule 12 blieb serumfrei (= Konjugat-Kontrolle). Nach Inkubation für 2 h bei 37°C und 3x fünfminütigem Waschen mit PBST wurde das Konjugat (Ziege-anti-Maus-IgG, AP-konjugiert) in Schritten von 1:2 über die Platte verdünnt. Dazu wurden 50 µl Verdünnungspuffer vorgelegt. Die Vertiefungen von Reihe A blieben frei. 100 µl einer 1:625 Konjugatverdünnung wurden in die Vertiefung von Reihe A pipettiert. Ausgehend von dieser Verdünnung wurde das Konjugat bis Reihe H jeweils 1:2 verdünnt und 1 h bei 37°C mit dem Serum inkubiert. Nach dreimaligen Waschen mit PBST und einmaligem Waschen mit Substratpuffer erfolgte die Substratzugabe. Die Reaktion wurde nach 5 min gestoppt und die Platten im Multiskan Plus ausgewertet.

3.2.4.1.2 Untersuchung von Serumproben und Hybridomaüberständen

Die Vertiefungen einer Ni-NTA-HisSorb-Mikrotiterplatte wurden mit 50 µl Antigen (= 1,25 µg PLHV-1-gB1-His) beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Waschen mit PBST (3x 5 min) wurden unspezifische Bindungsstellen durch Zugabe von 200 µl Blockpuffer je Vertiefung und 60-minütiger Inkubation bei 37°C gesättigt. Nach gründlicher Entfernung des Blockpuffers wurden 50 µl Serum (1:50 verdünnt) bzw. 50 µl unverdünnter Hybridomaüberstand in die Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettiert und für 2 h bei 37°C inkubiert. Als Referenzseren wurden das NS und PS aus der Maus in Dreifachansätzen untersucht, die Testseren in Doppelansätzen. Von den Hybridomaüberständen wurden nur Einzelwerte in Antigen-beschichteten Vertiefungen bestimmt, da der ELISA nur als Vorscreening diente, um den reaktivsten Überstand für immunhistochemische Untersuchungen (Kap. 3.2.4.2) zu identifizieren. Nach dreimaligen Waschen mit PBST und Entfernung restlichen Waschpuffers durch Ausschütten und Ausklopfen wurden 50 µl des AP-konjugierten, anti-Spezies-IgG-Sekundärantikörpers in die Vertiefungen gegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden erneut 3x 5 min mit PBST und zur Äquilibration einmal mit Substratpuffer gewaschen. Die erforderliche Anzahl an p-Dinitrophenylphosphat-Substrattabletten wurde in Substratpuffer gelöst und in jede Vertiefung 50 µl der Substratlösung pipettiert. Die Platten wurden für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl NaOH (2 mol/l) gestoppt und die Platten im Multiskan Plus bei einer Wellenlänge von 405 nm ausgewertet.

Für die Serum-Kontrolle wurden die Seren in Doppelansätzen in nicht mit Antigen beschichtete Vertiefungen pipettiert. Zusätzlich wurden Antigen- und Konjugat-Kontrollen in Doppelansätzen durchgeführt. Da die Extinktion der Substrat-Kontrolle in den Vorversuchen sehr gering war, wurde diese in den Hauptversuchen nicht mehr mitgeführt.

Für die Untersuchung von Milchserum musste die Milch (hier Kolostrum) vor Anwendung im ELISA durch Zentrifugation (5000 rpm, 15 min, 4°C, Heraeus) entrahmt werden (MacMillan et al., 1990).

3.2.4.2 Indirekter Immunfluoreszenztest

Diese Methode beruht auf der Verwendung von Antikörpern, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert und so im Fluoreszenzmikroskop sichtbar sind. Am häufigsten werden die Fluoreszenzfarbstoffe Tetramethylrhodamin und Fluoreszein verwendet. Beim dem in dieser Arbeit angewendeten indirekten Immunfluoreszenztest (iIFT) wurden zwei Antikörper benötigt: ein Antikörper, der spezifisch an viral exprimiertes Protein bindet und ein Sekundärantikörper, der spezifisch an den Primärantikörper bindet und der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Dadurch kann virales Protein auf indirektem Wege in einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Mit diesem Test sollte gB-Antigen in Blutlymphozyten PTLDErkrankter Miniaturschweine detektiert und seine Lokalisation in den Zellen bestimmt werden. Diese Untersuchung wurde sowohl an bereits vorgefertigten als auch an selbst hergestellten Zyto-Spins durchgeführt.

3.2.4.2.1 Beschichtung von Objektträgern mit Poly-L-Lysin

Zur besseren Haftung von Zellen und Vermeidung des Abschwimmens während des Färbeprozesses wurden Objektträger mit Poly-L-Lysin (0,01%) beschichtet. Vor der Beschichtung wurden die Objektträger für 10 min in einer mit Aceton gefüllten Färbeschale gestellt und anschließend zweimal mit ddH₂O gespült. Nach einer 30-minütigen Inkubation mit Poly-L-Lysin wurden die Objektträger erneut zweimal mit ddH₂O gespült und über Nacht bei 37°C in einem Brutschrank getrocknet.

3.2.4.2.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen wurde eine Lebend-Todfärbung mit Trypanblau durchgeführt. 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.

Tiefgefrorene Blutlymphozyten wurden nach dem Auftauen in einem 37°C warmen Wasserbad zentrifugiert (1000 rpm, 5 min, RT, Heraeus) und in 1 ml PBS aufgenommen. Für die Färbung wurden 10 µl der Zellsuspension mit 190 µl Trypanblau-Lösung (0,2%) gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Eine Neubauer-Zählkammer wurden mit der angefärbten Zellsuspension beschickt und die Lebendzellzahl unter dem Mikroskop bestimmt. Gezählt wurden nur strahlend weiße Zellen. Nach Auszählung aller acht großen Eckquadrate wurde der Mittelwert gebildet. Durch Multiplikation des 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.

3.2.4.2.3 Herstellung von Zyto-Spins

Blutlymphozyten wurden zur Durchführung des Immunfluoreszenztestes durch Zytocentrifugation auf Objektträgern fixiert. Durch diese Methode werden die Zellen abgeflacht, wodurch eine mögliche Fluoreszenz der Zellen besser lokalisiert werden kann.

Für die Anfertigung der Zyto-Spins wurden 2×10^5 Zellen benötigt, die sich in 150 bis 200 µl PBS befanden. Die mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger wurden zur Adsorption des Kulturmediums mit einem Filterpapier abgedeckt, in dem zwei Löcher perforiert waren, und in eine Zytocentrifugeneinlage eingespannt. Bis zu 200 µl der Zellsuspension wurden dann über einen Trichter in die Einlage pipettiert. Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation für 5 min bei 500 rpm in einer Zytocentrifuge durch die perforierten Löcher auf die Objektträger gebracht. Anschließend wurde die Apparatur einschließlich des Filterpapiers entfernt und die Objektträger bei RT getrocknet. Danach erfolgte die Durchführung des indirekten Immunfluoreszenztestes.

3.2.4.2.4 Durchführung des indirekten Immunfluoreszenztestes

Die durch Zytocentrifugation auf einen Objektträger transferierten Zellen wurden mit einem Markierstift (DAKO Pen) umrandet und für 15 min bei RT mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Bei den vorgefertigten Zyto-Spins entfiel der Fixierungsschritt. Nach dreimaligen Spülen mit PBS wurden die Zellen zur Permeabilisierung mit 0,1%

Triton X-100 inkubiert (10 min, RT). Die Zellen wurden erneut dreimal mit PBS gespült und anschließend zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen in einer feuchten Kammer mit Blockpuffer inkubiert (1 h, 37°C). Nach Spülen mit PBS wurde das Antiserum mit Blockpuffer 1:50 verdünnt, auf die Zellen gegeben und für 1 h bei 37°C mit den Zellen in einer feuchten Kammer inkubiert. Überschüssiger Primärantikörper wurde durch dreimaliges Spülen mit PBS entfernt. Der FITC-konjugierte Sekundärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:100 auf die Zellen gegeben und für 45 min bei 37°C mit den Zellen inkubiert. Die Zellen wurden dreimal mit PBS und einmal mit ddH₂O gewaschen. Ein Tropfen Eindeckmedium (Dako® Fluorescent Mounting Medium) wurde auf die Zellen gegeben und die Zellen mit einem Deckgläschen luftblasenfrei bedeckt. Die Proben wurden über Nacht bei 4°C ausgehärtet und am folgendem Tag mittels konfokaler Laserscanmikroskopie analysiert.

3.2.4.3 Immunhistochemie

Grundlage der Immunhistochemie ist die Erkennung von Antigenen durch spezifische Antikörper. Die Antigen-Antikörper-Bindung kann direkt oder indirekt durch verschiedene Markierungsmethoden sichtbar gemacht werden. In dieser Arbeit sollte Virusantigen in Lymphknoten mittels immunenzymatischer Methoden dargestellt werden. Das Prinzip dieser Technik beruht darauf, dass das jeweilige Markierungsenzym am Ort seiner Bindung (die über ein Antikörper-Molekül erfolgt ist) eine Reaktion katalysiert, durch die aus einem unsichtbaren, löslichen Substrat ein sichtbares, unlösliches Produkt entsteht. Die Immunreaktion wird über die Bildung dieses sichtbaren Produkts angezeigt. Häufig verwendetete Enzyme sind die Meerrettich-Peroxidase, die auch in dieser Arbeit verwendet wurde, sowie die alkalische Phosphatase.

Für die Darstellung von PLHV-1-Antigen in Paraffinschnitten von Lymphknoten wurde das UltraVision-Detection-System verwendet, das nach der Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode) arbeitet. Diese Methode basiert auf der Fähigkeit des Glykoproteins Streptavidin, vier Moleküle Biotin in einem festen Komplex zu binden. Der Ablauf dieser Immunenzymtechnik gliedert sich in drei Schritte. Zu Anfang wird der Gewebeschnitt mit einem unmarkierten Primärantikörper inkubiert. Im zweiten Schritt wird ein biotinylierten Sekundärantikörper zugegeben, der an den Primärantikörper bindet. Durch Zugabe von Meerrettich-Peroxidase konjugiertem Streptavidin, das an den Biotinrest des sekundären Antikörpers bindet, und dem Substrat Diaminobenzidin (DAB) wird die Immunreaktion kenntlich gemacht.

Vor Anwendung der ABC-Methode mussten die Schnitte entparaffinisiert und rehydratisiert werden. Dazu wurden die Paraffinschnitte 2x 10 min in Xylol inkubiert und durch Passieren einer absteigenden Alkoholreihe (je 5 min 95%iges, 80%iges und 70%iges Ethanol) und anschließendem dreiminütigem Spülen mit fließendem, destilliertem Wasser rehydratisiert. Für die Demaskierung der Antigene wurden zwei Methoden ausgetestet:

1. Erhitzen der Paraffinschnitte in 10 mM Citratpuffer (pH 6,0) im Autoklaven bei 121°C für 10 min.
2. Verwendung des AntigenPlus™ Puffer Sets: Inkubation bei RT oder für 3x 5 min in der Mikrowelle in Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten (pH 6, pH 7,4 und pH 10).

Nach Demaskierung und, falls erforderlich, Abkühlung der Schnitte auf RT wurden die Präparate mit dem Hydrogen Peroxid Block Reagenz zur Blockierung der endogenen Peroxidase bedeckt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Reagenz wurde durch 2x fünfminütiges Waschen mit PBS entfernt. Zum Sättigen unspezifischer Bindungsstellen wurden die Schnitte 5 min mit dem UltraV Block Reagenz bei RT inkubiert. Nach einem kurzen Spülvorgang in PBS (2x 30 sec) wurden die zuvor im Western Blot und im ELISA auf ihre Reaktivität untersuchten Hybridomaüberstände auf die Schnitte gegeben. Nach Inkubation bei 4°C über Nacht und 4x fünfminütigem Waschen mit PBS wurde der biotinylierte Sekundärantikörper für 10 min bei RT auf den Schnitten inkubiert. Erneut wurden die Schnitte 4x 5 min mit PBS gewaschen. Die Präparate wurden mit Peroxidase-konjugiertem Streptavidin bedeckt und für 10 min bei RT inkubiert. Die Schnitte wurden ein letztes Mal mit PBS gewaschen (4x 5 min). Zur Detektion wurden 1-2 Tropfen DAB-Chromogen zu 1 ml DAB-Substrat gegeben, gemischt und die Schnitte mit dieser Lösung bedeckt und 15 min bei RT inkubiert. Zur Kernfärbung wurden die Schnitte 3 min mit 0,1% Mayers Hämalaun inkubiert und 5 min unter fließendem Leitungswasser entfärbt. Die Schnitte wurden mit Dako® Fluorescent Mounting Medium eingedeckt und nach dem Trocknen des Eindeckmediums unter dem Lichtmikroskop ausgewertet. Vor Verwendung der wertvollen und nur spärlich vorhandenen Lymphknotenpräparate des an PTLD erkrankten Schweines wurden Lymphknotenpräparate eines Schlachtschweines mit unterschiedlichen Verdünnungen des Hybridomaüberstandes (1:20, 1:40, 1:80 und 1:160) inkubiert, um die Hintergrundfärbung, die von einem zu stark konzentrierten Überstand ausgehen könnte, zu minimieren. Alle Inkubationsschritte wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt, die Waschschrte in Färbeschalen. Um falsch-positive Reaktionen und auch mögliche Vorgehensfehler ausschließen zu können, wurden verschiedene Kontrollen mitgeführt.

Zum Ausschluß endogener Peroxidase-Aktivität wurden die Gewebeschnitte statt mit Primär- und Sekundärantikörper nur mit PBS inkubiert. Zum Nachweis, ob Streptavidin unspezifisch an den Schnitt bindet, wurde der biotinylierte Sekundärantikörper weggelassen. Zur Kontrolle, ob der biotinylierte Antikörper unspezifisch bindet, wurde dieser statt mit dem spezifischen monoklonalen Antikörper mit einem Kontrollüberstand inkubiert.

3.2.5 Statistische Auswertung

Zur deskriptiven Datenanalyse und zur graphischen Darstellung der Messergebnisse der ELISA-Untersuchungen wurde mit dem Statistikprogramm "SPSS für Windows" gearbeitet. Neben der Bestimmung von Lagemaßen (Medianwert, 1. und 3. Quartil, Minimum, Maximum) und Streuungsmaßen (Spannweite, Interquartilsabstand) wurden zur Darstellung der Messwertverteilung in den einzelnen Stichproben sogenannte "Box-and-Whisker-Plots" (Abb. 7) erstellt.

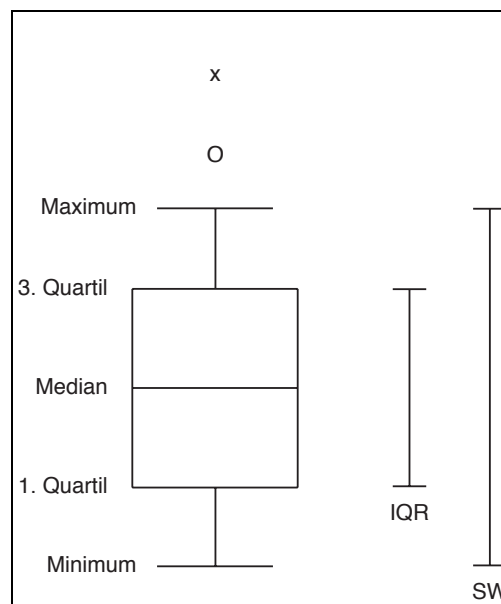


Abb. 7: Box-and-Whisker-Plot

Median: Wert, unter und über dem jeweils die Hälfte der Fälle liegt

Quartil: Wert, unter dem 25% (1. Quartil) bzw. 75% (3. Quartil) der Fälle liegen

Maximum: höchster beobachteter Wert, der kein Extremwert (o) oder Ausreisser (x) ist

Minimum: niedrigster beobachteter Wert, der kein Extremwert (o) oder Ausreisser (x) ist

o: Ausreisser ("outliers"); Werte, die zwischen 1,5 und 3 Boxenlängen vom oberen Quartilswert nach oben bzw. vom unteren Quartilswert nach unten abweichen

x: Extremwerte; Werte, die mehr als 3 Boxenlängen vom oberem Quartilswert nach oben bzw. vom unterem Quartilswert nach unten abweichen

IQR: Interquartilsabstand; Bereich zwischen dem 1. und 3. Quartil, in dem die mittleren 50% der Fälle liegen

SW: Spannweite; Bereich zwischen den höchsten und niedrigsten beobachteten Werten

Der Vergleich verschiedener Stichproben mit der Kontrollgruppe erfolgte durch rein deskriptive Betrachtung der Medianwerte, der Interquartilsabstände und der Spannweiten.