

2 Material

2.1 Bezugsquellennachweis

2.1.1 Geräte

ABI PRISMTM Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Foster City/USA
ABI PRISMTM 377 DNA Sequencer	Applied Biosystems, Foster City/USA
Bakterienschüttler	New Brunswick Scientific, Edison/USA
Blotkammer	BIO-RAD, Hercules/USA
Brutschränke	Binder, Tuttlingen/D Heraeus, D
Feinwaage	Sartorius, Göttingen/D
Fotodokumentationssystem	Intas, Göttingen/D
Gefrierschränke	-80°C Heraeus, Osterode/D Forma Scientific, Marietta/USA Liebherr, Biberach an der Riß/D
	-20°C Bosch, Stuttgart/D
Gelelektrophoresekammer	Biometra, Göttingen/D
Konfokales Laser Scannig Mikroskop	Zeiss, Jena/D
Kühlschränke	Bosch, Stuttgart/D Liebherr, Biberach an der Riß/D
Laborzentrifuge	Sorvall, Newton/USA
Lichtmikroskope	Zeiss, Jena/D Nikon, Tokio/J
Magnetrührer	Jahnke & Kunkel, Staufen/D
Microlumat Plus LB96V	EG&G Berthold, Bad Wilbach/D
Neubauer-Zählkammer	Roth, Karlsruhe/D
pH-Messgerät	Beckman, Palo Alto/USA
Pipettboy	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt/D
Pipetten	Gilson, Middleton/USA Eppendorf, Hamburg/D
Rocking Plattform	Biometra, Göttingen/D
Röntgenfilmentwickler	AGFA, Mortsel/B

Röntgenfilmkassetten	Rothhaar & Schroeder, Heidelberg/D
Spannungsgeräte	Biometra, Göttingen/D GibcoBRL, Gaithersburg/USA
SpeedVac	UniEquip GmbH, Martinsried/D
Thermoblock	BioSan, Warren, US
Thermocycler	Biometra, Göttingen/D Applied Biosystems, Foster City/USA Eppendorf, Hamburg/D
Tischzentrifuge	Heraeus Instruments, Newtown/USA
Transilluminator	Rothhaar & Schröder, Heidelberg/D
UV-Handlampe	Novodirekt, Karlsruhe/D
Vortexer	Jahnke & Kunkel, Staufen/USA
Wasserbad	Haake, Karlsruhe/D GFL, Burgwedel/D Roth, Karlsruhe/D
Zentrifugen	Heraeus, Osterode/D Ried im Innkreis/A

2.1.2 Biochemikalien

Sofern nicht anders vermerkt, wurden alle verwendeten Chemikalien bei der Firma Merck, Darmstadt bezogen und entsprachen dem Reinheitsgrad p.a. oder aber der höchsten verfügbaren Reinheitsstufe.

Acrylamid 30 % (Arylamid-Bisacrylamid 37,5:1)	Roth, Karlsruhe/D
Adeninhemisulfat (Ade)	Sigma, St. Louis/USA
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe/D
Albumin Fraktion V Protease frei (BSA)	Roth, Karlsruhe/D
Amidoschwarz	Serva, Heidelberg/D
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt/D
Ammoniumpersulfat (APS)	Bethesda Research Laboratories (BRL), Gaithersburg/USA
AquaPhenol™	Appligene-Oncor, Heidelberg/D
Bacto™Yeast Extract	BD, Heidelberg/D
Bacto™Peptone	BD, Heidelberg/D

Bacto™Tryptone	BD, Heidelberg/D
Bacto™Agar	BD, Heidelberg/D
Bidestilliertes Wasser (H ₂ O)	Fluka, Buchs/CH
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg/D
BSA	Roth, Karlsruhe/D
Chloroform/Isoamylalkohol	Appligene Oncor, Illkirch/F
Desoxyribonukleotide (dNTPs), (Expand High Fidelity PCR System)	Roche Diagnostics, Mannheim/D
Dextranblau	Serva, Heidelberg/D
Difco™Yaest Nitrogene Base	Difco, Detroit/USA
Dimethylformamid	Sigma, St. Louis/USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, St. Louis/USA
Dithiothreitol (DTT)	Life Technologies, Paisleys/UK
D-MEM	Life Technologies, Paisley/USA
Ethylendiamintetraacetylsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt/D
Ethanol	Merck, Darmstadt/D
Ethidiumbromid (EtBr)	Biomol, Hamburg/D
Formaldehyd	Merck, Darmstadt/D
Glycerin	Merck, Darmstadt/D
Glycin	Merck, Darmstadt/D
H ₂ O, RNase-, DNase-frei	Fluka, Buchs/CH
Igepal CA-630	Sigma, St. Louis/USA
IPTG	Biomol, Hamburg/D
Isopropanol	Merck, Darmstadt/D
L-Leucin	Roth, Karlsruhe/D
L-Histidin	Roth, Karlsruhe/D
β-Mercapthoethanol	Roth, Karlsruhe/D
Methanol	Merck, Darmstadt/D
N, N, N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Bethesda Research Laboratories (BRL), Gaithersburg/USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt/D
Natriumpyruvat	Invitrogen, Karlsruhe/D
Nichtessentielle Aminosäuren	Invitrogen, Karlsruhe/D
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Appligene, Illkirch/FR
Polyacrylamid Lösung 30 % (29:1)	Roth, Karlsruhe/D

Polyethylenglycol (PEG)	Fluka, Buchs/CH
Ponceau S	Sigma, St. Louis/USA
ReadyRed™ Chloroform :Isoamylalkohol (24 :1)	Appligene-Oncor, Heidelberg/D
RNase-freies bidestilliertes Wasser	Fluka AG, Buchs/Schweiz
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt/D
Sukrose	Biomol, Hamburg/D
TEMED (Tetramethyldiamin)	Roth, Karlsruhe/D
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Merck-Schuchart, Hohenbrunn/D
Tween 20	Roth, Karlsruhe/D
X-Gal (5-Bromo-4-chlor-3-indolyl- β-D-galactopyranosid)	Biomol, Hamburg/D

2.1.3 Enzyme, Marker

Sofern nicht anders vermerkt, wurden alle verwendeten Enzyme bei der Firma New England Biolabs, Beverly/USA bezogen und in den vom Hersteller empfohlenen Konzentrationen und Puffern.

AmpliTaq Gold DNA-Polymerase	Applied Biosystems, Branchburg/USA
<i>AarI</i>	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot/D
Ambion Super Taq Plus Polymerase	Ambion® Inc., Austin/USA
Benzonase (25 KU/μl)	EMD Biosciences, San Diego/USA
Complete Mini Protease Inhibitor	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim/D
High Fidelity Polymerase (3,5x10 ³ U/ml), (Expand High Fidelity PCR System)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim/D
Proteinase K (5 mg/ml)	Quiagen, Valencia/USA
SuperScript™ III Reverse Transcriptase	Life Technologies, Paisleys/UK
Super Taq Plus Polymerase	Ambion, Austin, USA
<i>TaKaRa LA Taq™</i>	Takara Bio Inc., Gennevilliers/F
<i>TaKaRa Ex Taq™</i>	Takara Bio Inc., Gennevilliers/F
Trypsin	Invitrogen, Karlsruhe/D

2.1.4 Proteinstandard

Precision Plus Protein™ Standards All Blue BIO-RAD, Hercules/USA

2.1.5 Nukleinsäuren

DNA aus Kalbsthymus (500 ng/μl, 2000ng/μl) Boehringer, Mannheim/D
 ϕX174-DNA, HaeIII Verdau (150 ng/μl) New England Biolabs, Beverly/USA
 λ-DNA, HindIII Verdau (150 ng/μl) New England Biolabs, Beverly/USA
 carrier DNA (Heringshoden, 20 mg/ml) Takara Bio, Otsu/J
 100 bp DNA ladder New England Biolabs, Beverly/USA

2.1.6 Antikörper

Primärantikörper

Anti-c-Myc; Kaninchen; 0,8 mg/ml SIGMA, St. Louis, USA
 Mouse anti-human nucleoli monoclonal antibody Chemicon, Atlanta, USA
 Monoclonal Anti-HA Clone HA-7 FITC conjugate; SIGMA, St. Louis, USA
 Maus; 0,7 mg/ml

Sekundärantikörper

Cy™5-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rabbit Jackson Immuno-research, Baltimore,
 IgG (H+L); 1,5 mg/ml USA
 Rodamine Red™-X-conjugated AffiniPure Goat Jackson Immuno-research, Baltimore,
 Anti-Mouse IgG (H+L) USA
 Ziege anti-Maus IgG polyklonal Dianova, Hamburg/D
 (POD-konjugiert, 0,8 mg/ml)
 Fluorescein (FITC)-conjugated AffiniPure Goat Jackson Immuno-research, Baltimore,
 Anti-Rabbit IgG (H+L) (1,5 mg/ml) USA
 Ziege anti-Kaninchen IgG polyklonal Dianova, Hamburg/D
 (POD-konjugiert, 0,6 mg/ml)

2.1.7 Vektoren

pcDNA3.1(+)	Invitrogen, Karlsruhe/D
pCMV-HA	Clontech, Saint-Germain-en-Laye/France
pCMV-myc	Clontech, Saint-Germain-en-Laye/France
pCR 2.1	Invitrogen, Karlsruhe/D
pEGFP-2C	Clontech, Saint-Germain-en-Laye/France
pGADT7	Clontech, Saint-Germain-en-Laye/France
pGADT7-T	Clontech, Saint-Germain-en-Laye/France
pGBKT7	Clontech, Saint-Germain-en-Laye/France
pGBKT7-Lam	Clontech, Saint-Germain-en-Laye/France
pGBKT7-53	Clontech, Saint-Germain-en-Laye/France
pGEM [®] -3Zf(+/-)	Promega, Madison/USA
pGL3-Promotor	Promega, Madison/USA
pHcRed1-N1/1	Clontech, Saint-Germain-en-Laye/France
pRSV-βGal	(32)
pUC19	New England Biolabs, Beverly/USA

2.1.8 Oligonukleotide und Primer

Die Namen und Sequenzen der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide und Primer sind dem Anhang A1 zu entnehmen.

2.1.9 Bakterienstämme, Hefestämme

Bakterienstämme

Escherichia coli DH5α (F[']/endA1 hsdR17(rk-,mk+) suPE44 thi-1 recAI gyrA, (Nal^r)relA1 D(lacZYA-argF)U169 deoR (φ80lacZΔM15))
Invitrogen, Karlsruhe/D, (50)

Escherichia coli TOP 10 (F['], mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK, rpsL, endA1, nupG)
Invitrogen, Karlsruhe/D

Hefestamm

AH109 (MATa trp1-901 leu2-3 112 ura3-52 Takara Bio, (70)
 his3-200 gal4 Δ gal80 Δ LYS2 :: GAL1UAS-
 GAL1TATA-HIS3 GAL2UAS- GAL2TATA-
 ADE2 URA3 :: MEL1UAS- MEL1-lacZ

2.1.10 Zelllinien

Die in den Versuchen verwendeten Zelllinien sind adhärenente Zelllinien.

<u>Zelllinie</u>	<u>Zelltyp</u>	<u>Verfügbarkeit Zell-Katalog-Nummer</u>
PS	Schweinenierenzellen	MWIIW
HEK-293	Humane embryonale Nierenzellen	ATCC: CRL 1573
HeLa	Humane Zervixarzinomzellen	ATCC: CCL 2
Huh7	Humane Leberzellen	JCRB: JCRB040
Vero	Grüne Meerkatze, Nierenzellen	ATCC: CCL 81

2.1.11 Antibiotika

Ampicillin	Sigma, St. Louis/USA
Kanamycin	Sigma, St. Louis/USA
Penicillin-Streptomycin (100 x)	Invitrogen, Karlsruhe/D

2.1.12 Filterpapier, Membranen

Filterpapier	Whatman, Dassel/D
Immubilon PVDF-Membran	Millipore, Schwalbach/D
Sterilfilter (0,2 und 0,45 μ l)	Roth, Karlsruhe/D

2.1.13 Reagenziensätze

ABI PRISM Big Dye™ Terminator Cycle v 3.0 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems (Perkin Elmer), Foster City/USA
Dneasy Tissue Kit	Qiagen, Valencia/USA
DO -Ade/-His/-Leu/-Trp	Takara Bio, Otsu/J
DO -Leu/-Trp	Takara Bio, Otsu/J
Dual-Light® System	Applied Biosystems, Bedford/USA
Western Blotting Detection Reagent	Amersham, Buckinghamshire/UK
Effectene Transfection Reagent	Qiagen, Hilden/D
Expand High Fidelity PCR System	Roche Diagnostics, Mannheim/D
FirstChoice™ RLM-RACE-Kit	Ambion® Inc., Austin/USA
Invisorb® Spin DNA Extraction Kit	Invitek, Berlin/D
Qiagen Plasmid Purification Maxi Kit	Qiagen, Valencia/USA
QIAprep 8 Miniprep Kit	Qiagen, Valencia/USA
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden/D
Rnase-free Dnase Set	Qiagen, Valencia/USA
Rneasy Mini Kit	Qiagen, Valencia/USA
TaKaRa Ex Taq™ PCR Kit	TaKaRa Biomedicals, Shiga/J
TNT® T7 Coupled Wheat Germ Extract System	Promega, Madison/USA
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen, Karlsruhe/D
Z-competent <i>E. coli</i> Buffer Set	Zymo Research, Orange/USA

2.1.14 Glaswaren

Bechergläser	Labor Brand, Gießen/D
Erlenmeyerkolben	Labor Brand, Gießen/D
Erlenmeyerkolben mit Schikane	Labor Brand, Gießen/D
Messzylinder	
Pipetten	Labor Brand, Gießen/D

2.1.15 Kunststoffartikel

Cryogefäße		Nunc, Roskilde/DK
Einweg-Zellkulturgefäße		Nunc, Roskilde/DK
PCR-Pipettenspitzen mit Aerosolschutz		Molecular BioProducts, San Diego/USA
PCR-Pipettenspitzen ohne Aerosolschutz		Süd Laborbedarf, Gauting/D
PCR-Reaktionsgefäße	0,2 ml	Eppendorf, Hamburg/D Applied Biosystems, Foster City/USA
Reaktionsgefäße	0,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht/D
	1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg/D
	15 ml, 50 ml	Falcon, Oxnard/USA Greiner, Nürtingen/D
Zentrifugengefäße		DuPont NEN, Boston/USA Kontron Instruments, Whatford/GB Falcon, Oxnard/USA
6-Loch Zellkulturplatten		TPP, Trasadingen, CH
24-Loch Zellkulturplatten		TPP, Trasadingen, CH
96-Loch Mikrotiterplatten		Nunc, Roskilde/DK

2.1.16 Weitere Verbrauchsmaterialien

Glutathion-Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare, Uppsala/S
Protein G-Sepharose	EMD Biosciences, San Diego/USA

2.2 Kulturmedien, Seren und Lösungen

2.2.1 *E. coli*

LB-Flüssigmedium	10 g/l	Bacto Trypton
	5 g/l	BactoYeast Extract
	10 g/l	NaCl
		pH 7,5 (NaOH)
		autoklavieren

LB-Agar	17 g/l	Bacto Agar in LB-Medium autoklavieren
SOB-Medium	20 g/l 5 g/l 0,58 g/l 0,19 g/l 10 mM 10 mM	Bacto Trypton Bacto Yeast Extrakt NaCl KCl pH 7,0 (NaOH) autoklavieren MgCl ₂ MgSO ₄ sterilfiltriert
SOC-Medium	20 mM	Glucose in SOB sterilfiltriert

2.2.2 Yeast Two Hybrid

YPDA-Agar	20 g/l 10 g/l 20 g/l 50 ml	Bacto Pepton Bacto Yeast Extract Agar Glucose (40 %) ad 1 l, pH 6,5 (HCl) autoklavieren
YPD-Medium	20 g/l 10 g/l 50 ml	Bacto Pepton Bacto Yeast Extrakt Glucose (40 %) ad 1 l, pH 6,5 (HCl) autoklavieren
YPDA-Medium	20 g/l 10 g/l 15 ml 50 ml	Bacto Pepton Bacto Yeast Extrakt Ade-Lösung (0,2 %) Glucose (40 %) ad 1 l, pH 6,5 (HCl) autoklavieren

2.2.3 Zellkultur

FKS	Life Technologies, Paisley/USA
D-MEM-Medium	DMEM-Pulver für 10 l 37 g NaHCO ₃ ad 10 l; pH 7,2 (HCl) sterilfiltrieren
Einfriermedium	50 % DMEM-Medium 40 % FKS 10 % DMSO
<u>Trypsin EDTA</u>	0,25 % Trypsin 3 mM EDTA in PBS, pH7,2

Zellkulturmedien (zelltypspezifisch)

HEK 293-Zellen; PS-Zellen	DMEM-Medium 5% FKS 1% Penicillin G/Streptomycin
HeLa-Zellen; Vero-Zellen	DMEM-Medium 10% FKS 1% Penicillin G/Streptomycin
Huh7-Zellen	DMEM-Medium 10% FKS 1% Penicillin G/Streptomycin 1% nichtessentielle Aminosäuren 1% Natriumpyruvat

2.3 Puffer- und Gebrauchslösungen

Wenn hier nicht angeführt, entspricht die Zusammensetzung der jeweiligen Puffer und Lösungen den entsprechenden Protokollen des Herstellers.

10% APS	100 g/l	APS
---------	---------	-----

MATERIAL

X-Gal-Lösung	50 g/l	X-Gal inDMF
PBS nach Dulbecco	140 mM	NaCl
	10 mM	Na ₂ HPO ₄
	2 mM	KCl
	2 mM	KH ₂ PO ₄
		pH 7,2 (HCl)
3 M NaAc-Lösung	246,09 g/l	NaAc
TE-Puffer	10 mM	Tris
	0,1 mM	EDTA
		pH 8,3 (HCl)
Restriktions-/Ligationspuffer	50 mM	Tris
	150 mM	NaCl
	10 mM	MgCl ₂
	5 mM	DTT
	1 mM	EDTA
		pH 7,5 (HCl)

2.3.1 Agarosegelelektrophorese

Ethidiumbromidlösung	10 g/l	Ethidiumbromid
DNA-Probenpuffer	7 Teile	Sucrose (70 %)
	5 Teile	Bromphenolblaulösung gesättigt
Laufpuffer	2x	TBE
	0,4 µg/ml	Ethidiumbromid
TBE-Puffer	45 mM	Tris-Borat
	1 mM	EDTA
		pH 8,3 (HCl)

2.3.2 SDS-PAGE

Färbelösung	20 ml	Methanol
	60 ml	ddH ₂ O
	20 ml	Roti-Blue (5x)
Entfärbelösung	25 %	Methanol
	5 %	Essigsäure
Laufpuffer	0,25 M	Tris
	2 M	Glycin
	1 %	SDS
2x Probenpuffer	0,125 M	Tris
	4 %	SDS
	20 %	Glycerin
	0,02 %	Bromphenolblau
	5 %	β-Mercapthoethanol
	2 mM	EDTA pH 6,8 (HCl)
Sammelgelpuffer	1 M	Tris pH 6,8 (HCL)
Trenngelpuffer	1,5 M	Tris pH 8,8 (HCl)
10% SDS-Lösung	100 g/l	SDS

2.3.3 Western Blot

Amidoschwarz-Färbelösung	0,2 G	Amidoschwarz
	90 ml	Methanol
	20 ml	Essigsäure (100 %)

Waschpuffer		PBS (pH 7,2)
	0,05 %	Tween 20
Blockpuffer		Waschpuffer
	5 %	Milchpulver
Transferpuffer	28 mM	Tris
	22 mM	Glycin
	0,1 %	SDS
	11 %	Methanol
		ad 1 l
Ponceau S-Färbelösung	0,1 %	Ponceau S
	1 %	BSA
Entfärbelösung	500 ml	Methanol (98 %)
	1400 ml	H ₂ O
	100 ml	Essigsäure (100 %)

2.3.4 Yeast Two Hybrid

0,2 % Ade-Lösung	2 g/l	Ade - autoklavieren
10x Trp-Lösung	200 Mg/l	Trp - autoklavieren
40 % Glucoselösung	400 g/l	Glucose – sterilfiltriert
10x Leu-Lösung	1000 Mg/l	Leu – autoklavieren
50 % PEG-Lösung	500 g/l	PEG 3350 – autoklavieren
10x LiAc-Lösung	1 M	LiAc – pH 7,5 (HCl) autoklavieren

X-Gal-Lösung	4 Mg/ml	X- α -Gal in DMF
PEG/LiAc-Lösung	8 ml	PEG (50 %)
	1 ml	TE (10x)
	1 ml	LiAc (10x) - autoklavieren
20 % SDS-Lösung	200 g/l	SDS
10x TE-Puffer	0,1 M	Tris
	10 mM	EDTA – pH 7,5 autoklavieren
TE/LiAc-Lösung	8 ml	ddH ₂ O
	1 ml	TE (10x)
	1 ml	LiAc (10x) autoklavieren

2.4 Software

ABI PRISM™ DNA Sequencing Analysis	Applied Biosystems, Foster City/USA
Auto Assembler™	Applied Biosystems, Foster City/USA
EndNote X1	Thomson ResearchSoft, Carlsbad/USA
Factura™	Applied Biosystems, Foster City/USA
FileMaker Pro 9.0	FileMaker Inc., Unterschleißheim/D
Freehand MX	Adobe Systems Inc., San Jose/USA
MacVector™	MacVector, Inc., Oxford Molecular/UK
Photoshop	Adobe Systems Inc., San Jose/USA
PrimerPremier™	PREMIER Biosoft International, Palo Alto, USA

3 Methoden

3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.1.1 Prinzip der DNA-Amplifikation durch die PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion gewährleistet die exponentielle Amplifikation eines spezifischen Nukleinsäurebereiches (122). Die PCR durchläuft drei unterschiedliche Temperaturstufen, welche sich zyklisch wiederholen. Im ersten Schritt erfolgt eine Temperaturerhöhung auf 92 bis 98°C für 3 - 10 min um die DNA, die zu Beginn als komplexe, hochmolekulare Struktur vorliegt, in ihre Einzelstränge zu trennen. In weiteren Denaturierungsschritten kann die Dauer in Abhängigkeit von der Amplifikatlänge verkürzt werden. Im zweiten Schritt folgt die Anlagerung (Annealing) zweier sequenzspezifischer Oligonukleotide (Primer) an die komplementären DNA-Stränge (Matrize). Dabei ist die Annealing-Temperatur der Schmelztemperatur der Primer anzunähern, um die spezifische Bindung zu garantieren. Im dritten Schritt wird die Temperatur auf 72°C erhöht, was dem Aktivitätsoptimum der verwendeten, thermostabilen DNA-Polymerase entspricht. Diese ermöglicht eine schnelle Verlängerung (Extension) der Primer und somit die Synthese des zur Matrize komplementären DNA-Stranges (Elongation). Die für die Elongation benötigte Zeit ist dabei abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes. Auf die Elongation folgt wieder die Denaturierung. Durch aufeinanderfolgende Zyklen (30 - 35) von Denaturierung, Annealing und 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.

3.1.1.1 DNA-Amplifikation

Für die Amplifikation klonierungsrelevanter genetischer Bereiche, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Enzymgemisch aus hitzestabiler *Taq*-DNA-Polymerase und einer *Tgo*-Polymerase mit 3'-5'-Exonukleasefunktion (*proof-reading* Aktivität) verwendet (Expand High Fidelity PCR System, EHF). Die Reaktionsbedingungen der PCR wurden

entsprechend den Empfehlungen des Herstellers eingestellt. In einem Volumen von 50 μl wurden 10-250 ng Plasmid-DNA, jeweils 300 nM der Primerlösungen, 200 μM dNTPs (jeweils), 5 μl Puffer (10fach konzentriert) und ddH₂O gemischt und mit 0,75 μl „Expand High Fidelity“-Enzymmix vereinigt. Das Temperaturprofil sowie die Reaktionszeiten innerhalb des PCR-Zyklus wurden in Abhängigkeit von der Schmelztemperatur (T_m -Wert) der eingesetzten Primer (s. Anhang A.1) und der Länge der zu amplifizierenden DNA gewählt.

EHF - PCR Programm			
	Temperatur	Zeit	
Denaturierung	94°C	2 min	
Denaturierung	94°C	15 sec	30x
Primerbindung	60°C	30 sec	
DNA-Synthese	72°C	45 sec	
Abschließender Synthese-Schritt	72°C	7 min	
Lagerung	4°C	∞	

Um die Größe der amplifizierten PCR-Produkte zu kontrollieren, wurden diese im Anschluss über Agarosegelelektrophorese (s. 3.5.1) aufgetrennt. Nach Aufreinigung über eine Silikagelmembran (s. 3.3.2) oder über ein Agarosegel (s. 3.3.1) konnten die DNA-Fragmente für die Restriktionsanalyse (s. 3.2.1) eingesetzt werden.

3.1.1.2 Amplifikation GC-reicher DNA-Abschnitte

Sowohl die maximale Länge der zu amplifizierenden DNA, als auch die Fähigkeit der Amplifikation von GC-reichen Bereichen, wird durch die Prozessivität der verwendeten DNA-Polymerase bestimmt.

In der vorliegenden Arbeit sollten sowohl das gesamte, 3,8 kb umfassende, TTV-Genom als auch GC-reiche Bereiche aus der nicht-translatierten Region (UTR) des Isolates P/1C1 amplifiziert werden. Dabei machte der GC-reiche Abschnitt besondere Pufferbedingungen notwendig, welche durch den GC Puffer I des LA PCR Kit Ver.2.1 (TaKaRa Bio Inc., Japan) gewährleistet wurden. In Abhängigkeit von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes wurde die *TaKaRa LA Taq*[™] (LA: long and accurate) oder die *TaKaRa Ex Taq*[™] verwendet. Die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches wurde entsprechend der

Herstellerempfehlung für die *TaKaRa LA Taq™* auf die *TaKaRa Ex Taq™* übertragen. So wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl, 100 ng Matrize, 25 µl GC Puffer I (2x), 8 µl dNTP-Mix (400 µM je dNTP), jeweils 0,2 µM Primerlösung und 2,5 U Polymerase eingesetzt und die Differenz mit ddH₂O aufgefüllt.

<i>TaKaRa LA/Ex Taq™</i> - PCR Programm		
	Temperatur	Zeit
Denaturierung	98°C	5 min
Denaturierung	98°C	20 sec
Primerbindung	60°C	30 sec
DNA-Synthese	72°C	1 min
Abschließender Synthese-Schritt	72°C	7 min
Lagerung	4°C	

} 35x

Die Größe der amplifizierten PCR-Produkte wurde im Anschluss über Agarosegelelektrophorese (s. 3.5.1) bestimmt und das Amplifikat über eine Silikagelmembran (s. 3.3.2) oder über ein Agarosegel (s. 3.3.1) aufgereinigt. Nach Aufreinigung konnten die DNA-Fragmente für die weitere Klonierung eingesetzt werden.

3.1.1.3 *Semi-nested PCR*

Die sogenannte semi-nested PCR bedient sich zweier Primersätze für die Amplifikation eines spezifischen DNA-Abschnitts, die in zwei unabhängigen, aufeinander folgenden PCR-Reaktionen eingesetzt werden. In der ersten PCR wird ein Amplifikat synthetisiert, welches in der zweiten PCR-Reaktion als Matrize dient und durch einen inneren und einen Primer der ersten PCR amplifiziert wird. Dabei sollten in der zweiten PCR Nebenprodukte der ersten Runde nicht weiter vervielfältigt werden. Der Vorteil einer semi-nested PCR liegt demnach in der erhöhten Spezifität und Sensitivität der Gesamtreaktion.

In der vorliegenden Arbeit wurde die semi-nested PCR für die Diagnostik zur Detektion möglicher TTV-DNA eingesetzt. Dabei wurde ein etabliertes System (13) verwendet, bei welchem die Primer in einer konservierten Region der UTR binden.

<i>AmpliTaq Gold</i> - PCR Programm		
	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95°C	9 min
Denaturierung	95°C	30 sec
Primerbindung	64°C/59°C	30 sec
DNA-Synthese	72°C	40 sec
Abschließender Synthese-Schritt	72°C	7 min
Lagerung	4°C	

Die Reaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 25 µl unter Verwendung der AmpliTaq Gold Polymerase. So wurde zu 2,5 µl Puffer (10x), 0,5 µl dNTP (jeweils 10 mM), 2 µl MgCl₂ (25 mM), 1,25 µl DMSO (25 %), 0,2 µl AmpliTaq Gold Polymerase (2 U) und DNA pipettiert.

Als Primerpaar der ersten Runde wurde NG343 und NG344, in der zweiten Runde NG343 und TTSPEN eingesetzt. Aus der ersten Runde wurde 1 µl in die zweite Runde übertragen. Die Zyklenzahl wurde von 35 Wiederholungen in der ersten Runde auf 25 Wiederholungen in der zweiten Runde herabgesetzt.

Die Produkte der ersten und der zweiten PCR-Reaktion wurden anschließend in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt.

3.1.2 Amplifikation von RNA (Reverse Transkriptase PCR)

Zum Nachweis und zur Charakterisierung TTV-spezifischer Transkripte wurde ein PCR-System verwendet werden, dass es ermöglicht, Untersuchungen hinsichtlich der Genexpressionen in Zellen ausgehend von schwachen Transkripten durchzuführen.

Da RNA nicht direkt als Matrize für die Taq-Polymerase genutzt werden kann, wird diese zunächst in eine der RNA komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Enzyme, welche die Synthese der DNA ausgehend von einer RNA-Matrize vermitteln, werden als Reverse Transkriptasen (RTasen) oder auch RNA-abhängige DNA-Polymerasen bezeichnet. Die PCR wird entsprechend als RT-PCR bezeichnet. Ausgehend von der neusynthetisierten einzelsträngigen cDNA erfolgt dann die spezifische Amplifikation über eine sogenannte RACE-PCR (rapid amplification of cDNA-ends).

3.1.2.1 Erststrang-cDNA-Synthese ausgehend vom 3'-Ende

Die Messenger RNA (mRNA) stellt die unmittelbare RNA-Kopie eines Gens nach der RNA-Prozessierung dar. Sie ist im Allgemeinen durch eine Cap-Struktur am 5'-Ende und einem Poly(A)-Ende am 3'-Ende charakterisiert. Die Erststrangsynthese der cDNA erfolgte nach Anlagerung eines poly dT-Oligonukleotides. Für die RT-PCR wurden Reagenzien des FirstChoice® RLM-RACE Kits (Ambion) mit der SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen) kombiniert, um eine optimale Ausbeute an cDNA zu erhalten. Die Reaktion erforderte eine Gesamt-RNA-Menge von 1 µg, 4 µl dNTP (2,5 mM jeweils), 2 µl 3'-RACE Adapter, 4 µl 5 x First-Strand-Buffer, 1 µl DTT (0,1 M), 1 µl RNase Inhibitor (10 U/µl) und 1 µl SuperScript™ III (200 U/µl). Der Gesamtansatz von 20 µl wurde für die cDNA-Synthese eine Stunde bei 42°C im Heizblock inkubiert.

Die so synthetisierte cDNA konnte zur Lagerung bei -20°C eingefroren oder in einer RACE-PCR eingesetzt werden (s. 3.1.3).

3.1.2.2 Erststrang-cDNA-Synthese ausgehend vom 5'-Ende

Die unmittelbare reverse Transkription der mRNA in cDNA ausgehend vom 5'-Ende ist aufgrund der m^7G -Cap Struktur, welche die RNA vor dem Abbau durch Exonukleasen schützt, nicht möglich. Erst das enzymatische Abspalten des modifizierten Guanin-Nukleotids und die anschließende Ligation eines Adapters an das freie 5'-Ende ermöglicht das Umschreiben der RNA mit spezifischen Adapter-Primern in cDNA.

Der aus den Zellen extrahierten Gesamt-RNA wurde die Phosphatase aus Kälberdarm (CIP, Calf intestinal phosphatase) zugeführt, welche die Phosphatgruppe am 5'-Ende der RNA, welche nicht durch die Cap-Struktur geschützt ist, abspaltet. Dabei wurden 10 µg eingesetzte Gesamt-RNA für 1 h bei 37°C mit CIP inkubiert.

CIP Anwendung	
10 µg	Gesamt-RNA
2 µl	10x CIP Puffer
2 µl	CIP
ad 20 µl	ddH ₂ O (RNase frei)

Eine anschließende Phenol-Chloroform-Extraktion trennte die Nukleinsäuren von Proteinen und entfernte damit das zugesetzte Enzym. Dabei wurde die wässrige Lösung mit 1 Volumen Phenol-Chloroform versetzt und gemischt. Die Nukleinsäuren bleiben aufgrund ihrer hydrophilen Gruppen in der oberen wässrigen Phase gelöst, während Proteine zwischen beiden Phasen, in der sog. Interphase, präzipitieren.

Phenol - Chloroform Extraktion	
15 µl	Ammonium Acetat Lösung
115 µl	Bidest
150 µl	Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol 25:24:1

Nach Zentrifugation bei >10.000 g für 5 min bei 20°C wurden die Phasen getrennt. Die obere, wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 150 µl Chloroform versetzt und gevortext. Die anschließende Zentrifugation für 5 min bei 20°C und >10.000 g (Heraeus, Omnifuge 2.0RS) entfernt Phenolreste aus der wässrigen Phase. Nach Zugabe von 150 µl Isopropanol, Vortexen und zehnmündiger Inkubation auf Eis wurde die RNA gefällt und durch Zentrifugation (4°C, 10000g, 20 min) gefällt. Es wurde mit 500 µl vorgekühltem 70 % Ethanol gewaschen und wiederum bei 4°C 5 min mit maximaler Drehzahl pelletiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet getrocknet und in 11 µl ddH₂O aufgenommen.

Der so aufgereinigten RNA wurde in einer weiteren Modifikation die Cap-Struktur mittels TAP (Tobacco Acid Pyrophosphatase) enzymatisch abgespalten. Die TAP Reaktion wurde für 1 h bei 37°C inkubiert.

TAP-Gebrauch	
5 µl	CIP-behandelte RNA
1 µl	10 x TAP Puffer
2 µl	TAP
ad 10 µl	ddH ₂ O

Nach der TAP-Gebrauch verblieb das 5'-α-Phosphat an der mRNA, sodass diese unmittelbar einer Ligationsreaktion zugänglich war. Die T4-RNA-Ligase ligierte dabei einen spezifischen 45 bp langen Oligonukleotidadapter an das 5'-Ende der mRNA. Inkubiert wurde 1 h bei 37°C.

Ligation		
2	μl	CIP/TAP-RNA
1	μl	5'-RACE-Adapter
1	μl	10 x RNA Ligase Puffer
2	μl	T4-RNA-Ligase (2,5 U/μl)
ad 10	μl	ddH ₂ O (Nuclease frei)

In einer reversen Transkriptionsreaktion konnte die modifizierte mRNA mittels randomisierter Primer in cDNA umgeschrieben werden. Wie für die RT vom 3'-Ende ausgehend beschrieben, wurden Reagenzien des FirstChoice® RLM-RACE Kits (Ambion) mit der SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen) kombiniert.

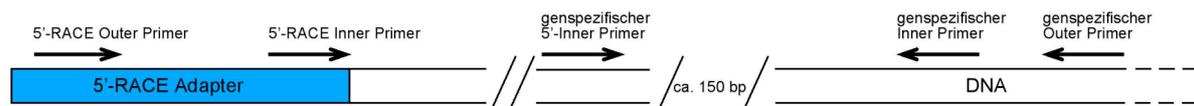
Reverse Transkription		
2	μl	Ligierte RNA
4	μl	dNTP Mix
2	μl	Randomisierte Decamerprimer
4	μl	5 x First Strand Buffer
1	μl	DTT (0,1 M)
1	μl	RNase Inhibitor
1	μl	Superscript III
ad 20	μl	ddH ₂ O

Die cDNA Synthese erfolgte in einer einstündigen Inkubation bei 42°C. Aus diesem Reaktionsgemisch konnten in einer sogenannten RACE-PCR 5'-cDNA Enden amplifiziert und anschließend analysiert werden (s. 3.1.3)

3.1.3 RACE-PCR

Die RACE-PCR (*rapid amplification of cDNA-ends*) ermöglicht die Vervielfältigung von cDNA Enden im Anschluss an eine RT-PCR. Dabei werden genspezifische Primer und Primer mit komplementären Bindungsstellen im Adapterbereich in nested- oder semi-nested PCR eingesetzt (Abb. 3-1).

5'-RACE



3'-RACE

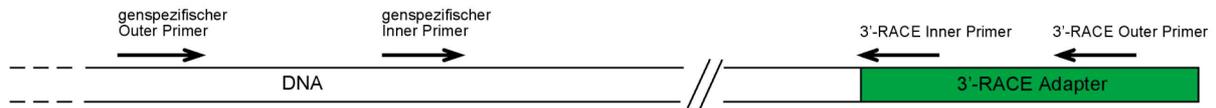


Abbildung 3-1: Schematische Darstellung der 5'- und 3'-RACE nach dem FirstChoice™ RLM-RACE-Kit

Für die RACE-PCR wurden Reagenzien des FirstChoice® RLM-RACE Kits (Ambion) mit der Super Taq Plus Polymerase (Ambion) kombiniert. Die Reaktion erforderte den Einsatz von 1 µl der RT-PCR, 5 µl 10x PCR-Puffer, 4 µl dNTP-Mix (2,5 mM je dNTP), 2 µl 3'- oder 5'-RACE genspezifischer Primer (10 µM), 2 µl 3'- oder 5'-RACE Outer/Inner Primer (10 µM), 1,25 U Ambion Super Taq Plus Polymerase. Der Gesamtansatz von 50 µl durchlief folgendes Programm:

<i>RACE</i> -PCR-Programm		
	Temperatur	Zeit
Denaturierung	94°C	3 min
Denaturierung	94°C	30 sec
Primerbindung	~ °C	30 sec
DNA-Synthese	68°C	4 min
Abschließender Synthese-Schritt	68°C	10 min
Lagerung	4°C	

Die anschließende Sequenzierung der Amplifikate ermöglicht die Identifizierung eventueller Spleißstellen, Transkriptionsstartpunkte oder des Transkriptaufbaus.

3.2 DNA-Rekombinationstechniken

3.2.1 Restriktionsanalyse

Die Restriktionsanalyse ist eine Methode zur Charakterisierung, Isolierung und Identifizierung doppelsträngiger DNA. Sie ist Voraussetzung für die Klonierung von DNA-Molekülen. Die Basis für dieses Verfahren bildet die Aktivität der Restriktionsendonukleasen, welche an spezifischen Erkennungsstellen doppelsträngige DNA hydrolytisch spalten. Sie sind bakteriellen Ursprungs und unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Erkennungssequenz und Spaltstelle.

Es werden drei Typen von Restriktionsendonukleasen unterschieden. Typ I und Typ III der Restriktionsenzyme vereinen die Funktionen Endonuklease und Methylase, während Typ II ausschließlich doppelsträngige DNA restringiert. Letztere spaltet an spezifischen Erkennungssequenzen, die aus 4 - 8 bp bestehen und zumeist palindromisch ist. Dabei können die entstehenden Spaltstellen als glatte Enden (blunt) oder als überhängende Enden (sticky) nach der Restriktion vorliegen.

Um die für die Restriktionsendonukleasen erforderlichen, spezifischen Bedingungen zu gewährleisten, werden vom Hersteller zumeist 10fach konzentrierte Puffer mitgeliefert. Für ein Reaktionsoptimum wird 1 Unit (U) Enzym verwendet. Dabei entspricht 1 U der Enzymmenge, die in einer Stunde unter optimalen Bedingungen 1 µg Substrat bei 37°C umsetzt.

Für den Restriktionsansatz ist zu beachten, dass die Menge des eingesetzten Enzyms 1/10 des Gesamtvolumens nicht überschreiten sollte, da andernfalls ein erhöhter Glycerolwert die Reaktion negativ beeinflussen könnte (*Star*-Aktivität)

Im Anschluss an den enzymatischen Verdau kann das Produkt gelelektrophoretisch aufgetrennt oder aufgereinigt werden, um nachfolgende Reaktionen nicht zu beeinträchtigen (s. 3.5.1; s. 3.3.1).

3.2.1.1 Einführen von Punktmutationen in die DNA-Sequenz

Das Einfügen von Punktmutationen, d.h. Substitution von einem Nukleotid kann durch den Einsatz von Primern erfolgen. Sind im Bereich der einzufügenden Mutation keine geeigneten Restriktionsstellen vorhanden, können Restriktionsenzyme eingesetzt werden, welche unmittelbar neben ihrer Erkennungssequenz schneiden. Das Enzym *Aar I* schneidet 4 nt nach der Erkennungssequenz, sodass nach Verdau des Amplifikats ein Teil des Primers, einschließlich der Erkennungssequenz entfernt wird. Zur Mutagenese wurden zwei PCR-Ansätze durchgeführt, deren Amplifikate im Bereich der Mutation, nach Verdau mit *Aar I* überlappten (Abb. 3-2) (168).

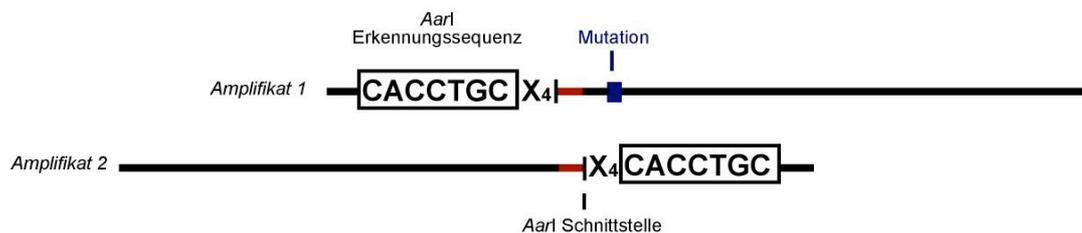


Abbildung 3-2: Einführen einer Punktmutation mittels PCR. Zwei Amplifikate überlappen nach Restriktion mit dem Restriktionsenzym *Aar I* (roter Bereich). Über diesen Überhang können die beiden Amplifikate ligiert und schließlich in einen Vektor kloniert werden. Der Austausch des Nukleotids wird durch einen Primer gewährleistet.

3.2.2 DNA-Restriktion von 3'-überhängenden Nukleotiden

Die Taq Polymerase synthetisiert einen Überhang von Adenosin am 3'-Ende von PCR-Amplifikaten. Für eine folgende Ligation von DNA-Fragmenten mit glatten Enden ist die Restriktion des Überhangs notwendig. Verwendet wurde die T4 DNA Polymerase, welche ähnlich dem Klenow-Fragment eine 3'-5'-Exonukleasefunktion besitzt und somit überstehende Nukleotide am 3'-Ende der Nukleinsäure abspalten kann. Hierzu wurden ad 80 µl 1x T4 DNA Polymerase Puffer, dNTPs ($C_{\text{final}} = \text{je } 30 - 200 \text{ µM}$), 1U T4 DNA Polymerase (1U/1 µg DNA) gemischt und für 15 min bei 12°C inkubiert. Nach Zugabe von EDTA (10mM Endkonzentration) wurde das Enzym bei 75°C für 20 min inaktiviert.

3.2.3 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um bei ungerichteter Klonierung die Religation plasmidaler DNA zu limitieren wird diese mit Hilfe der Antarctic Phosphatase der Firma NEB der Phosphatrest am 5'-Ende der DNA abgespalten.

Der aus dem Agarosegel eluierten (s. 3.3.1) Vektor-DNA wurden in einem Gesamtansatz von 50 µl jeweils 5 µl Antarctic Phosphatase Puffer (10x) und 5 U Antarctic Phosphatase (5 U/1 µg DNA) zugesetzt. Die Inkubationszeit wurde entsprechend der Position des Phosphatrestes gewählt. Für die Dephosphorylierung des 5'-Überhangs reichte eine Inkubation von 15 min, bei einem 3'-Überhang war eine Inkubation von 1h bei 37°C im Wasserbad notwendig. Die dephosphorylierte DNA wurde nachfolgend in der Ligationreaktion (s. 3.2.5) eingesetzt.

3.2.4 Phosphorylierung von DNA-Fragmenten

Nach dem Abspalten überstehender Nukleotide von restringierten DNA-Fragmenten lag diese DNA nicht phosphoryliert vor. Um diese DNA-Fragmente für eine folgende Ligation zugänglich zu machen wurde die Phosphorylierung mittels Polynukleotidkinase in Gegenwart von ATP durchgeführt. Dieses stellt den auf das 5'-Hydroxyende zu übertragenden Phosphatrest bereit. Dabei wurden in einem Reaktionsansatz 300 pmol DNA, 5 µl T4-DNA-Ligasepuffer (10x) für 5 min bei 72°C präinkubiert und anschließend mit 10 Units T4-Polynukleotid-Kinase und 6,25 µl PEG 8000 (5 % Endkonzentration) sowie ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 50 µl gebracht und für 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung des Enzyms für 20 min bei 65°C gestoppt und die DNA bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

3.2.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Hybridisierte Oligonukleotide oder proteolytisch restringierte DNA können unter Verwendung einer Ligase zu rekombinanten DNA-Molekülen verbunden werden. In Abhängigkeit der durch den Restriktionsverdau erzeugten Enden (kohäsiv oder sticky ends) ist das Verhältnis der jeweiligen Moleküle während der Reaktion zu beachten. Sind Vektor und Insert mit dem gleichen, kohäsive Enden erzeugenden Restriktionsenzym geschnitten

worden, können durch Zugabe einer DNA-Ligase die Fragmente durch Ausbildung von 3'-5'-Phosphodiesterbindungen zwischen den beiden Strängen miteinander verbunden werden. Dabei ist die Kompatibilität der Enden zueinander zu beachten. Das Verhältnis der DNA-Fragmente kann 1:1 betragen. Durchgeführt werden kann die Reaktion bei Raumtemperatur. Werden in der Ligation Fragmente mit glatten Enden zusammengefügt ist der Einsatz höherer Substrat- und Enzymmengen, sowie eine niedrigere Temperatur (16°C) notwendig um eine optimale Ausbeute rekombinanter DNA-Moleküle zu generieren. Zudem trägt das stöchiometrische Verhältnis zwischen den DNA-Fragmenten (Vektor:Insert: 1:3 - 1:5) zur effizienten Ligation bei.

Die Ligation wurde in der Regel in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit der T4-DNA-Ligase (isoliert aus dem Phagen T4) durchgeführt und erfolgte über Nacht bei 16°C bzw. für eine Stunde bei Raumtemperatur.

3.2.6 TOPO TA Cloning

Eine besondere Form der Ligation ist das TOPO TA Cloning. Die Besonderheit dieses Systems stellt eine an den offenen pCR2.1-TOPO-Vektor gekoppelte Topoisomerase dar. Diese kann ein DNA-Fragment an den Vektor binden und wird dabei selbst freigesetzt. Topoisomerasen führen zur Relaxation der DNA, wobei sie Phosphodiesterbindungen spalten und dabei eine kovalente Bindung mit der DNA ausbilden. Durch die Verknüpfung mit einer 5'-Hydroxylgruppe eines anderen DNA-Stranges wird der Strang geschlossen und die Topoisomerase dissoziiert von der DNA. Angewendet wird dieses System für die ungerichtete Ligation, da Restriktionsstellen nicht erforderlich sind.

Die PCR wurde mit einer Taq-DNA-Polymerase durchgeführt (s. 3.1.1.3). Diese synthetisiert einen Überhang von Adenosin am 3'-Ende der Amplifikate. Der pCR2.1-TOPO-Vektor besitzt an seinem 3'-Ende einen Thymidinüberhang, wodurch die Ausbildung eines Hybrids mit dem PCR-Produkt die Ligation erleichtert.

TOPO TA Cloning

4 µl	PCR-Amplifikat
3 µl	Salt Solution
1 µl	TOPO Vektor

Der Ansatz wurde auf Eis pipettiert und 5 min inkubiert. Die sich anschließende Transformation wurde in *E. coli* DH5 α Zellen oder *E. coli* TOP 10 Zellen durchgeführt (s. 3.4.2).

3.2.7 Klonierung von PCR-Produkten

Werden zu klonierende DNA-Fragmente mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ausgehend von einer geeigneten Matrize amplifiziert, so besteht die Möglichkeit über die verwendeten Primer geeignete Restriktionsstellen einzuführen.

Die Nukleotidsequenz der Primer gewährleistet einerseits Komplementarität mit einer kurzen Sequenz am Anfang der zu amplifizierenden DNA Matrize und trägt zusätzlich am 5'-Ende die Erkennungssequenz der entsprechenden Restriktionsendonuklease.

Nach der Aufreinigung (s. 3.2.2) wurde das PCR-Produkt geschnitten (s. 3.2.1), erneut aufgereinigt (s. 3.2.2) und in einen geeigneten Vektor kloniert (s. 3.2.5).

3.2.8 Hybridisierung von Nukleinsäuren

Die Hybridisierung zweier zueinander komplementärer Oligonukleotide führt zur Ausbildung eines Doppelstranges. Für die Generierung einer doppelsträngigen Sequenz wurden Oligonukleotide mit Längen von 25 - 40 bp verwendet, die sich in mindestens 10 nt überlappten. Jeweils 1 μ l zueinander komplementärer Oligonukleotide (100 pmol/ μ l) wurden in einem Gesamtansatz von 12 μ l für 5 min auf 95°C erhitzt und langsam auf Raumtemperatur gebracht. Um ein gleichmäßiges Abkühlen zu ermöglichen, wurde der Reaktionsablauf im Thermocycler von 95°C auf 20°C in Schritten von 1°C gesenkt. Die Dauer der einzelnen Schritte betrug im Bereich der Schmelztemperaturen der Oligonukleotide 30 sec, in höheren und niedrigeren Temperaturbereichen 15 sec. Zur Kontrolle der Hybridisierungsreaktion wurde der komplette Hybridisierungsansatz über ein Agarosegel aufgetrennt um doppelsträngige von einzelsträngiger DNA zu trennen. Der Doppelstrang wurde anschließend aus dem Gel eluiert (s. 3.3.1).

3.2.9 Herstellung religierter Virus DNA

Für die Transkriptkartierung und den Replikationsassay ist die zirkuläre Form des TTV-Isolates P/1C1 notwendig. Das Gesamt-Genom wurde in den Vektor pGl3-Promotor kloniert. Von diesem ausgehend wurde das virale Genom, mittels des Restriktionsenzym *Kpn* I proteolytisch aus dem Vektor geschnitten, gelelektrophoretisch aufgetrennt und nach Elution aus dem Agarosegel (s. 3.3.2) religiert (s. 3.2.5). Nach einer weiteren Aufreinigung über eine Silikagelmembran (s. 3.3.2) und einer Konzentrationsbestimmung (s. 3.4.4.2) konnte die nun zirkulär vorliegende DNA zur Transfektion eingesetzt werden.

3.3 Extraktion und Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Um DNA-Fragmente nach PCR oder Restriktionsanalyse in weiteren Klonierungsschritten einsetzen zu können mussten diese von anderen Nukleinsäuren, Proteinen oder Salzen, welche folgende Reaktionen negativ beeinflussen könnten abgetrennt werden. Dabei wurden entsprechend ihrer Beschaffenheit und ihrer Fragmentlänge unterschiedliche Methoden verwendet.

3.3.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Aufreinigung restringierter Klonierungsvektoren und hybridisierter Oligonukleotide (s. 3.3.1) wurde im Anschluss an eine Gelelektrophorese geeigneter Konzentration durch die Anwendung des „Invisorb® Spin DNA Extraction Kit“ der Firma Invitex, Berlin/D gewährleistet. Dabei basiert die Extraktion und Aufreinigung zum einen auf der Löslichkeit von Agarose und zum anderen auf der selektiven, quantitativen Adsorption von Nukleinsäuren an eine Silikagelmembran in Gegenwart hoher Salzkonzentration. Andere Bestandteile passieren die Membran ungebunden.

Das zu isolierende DNA-Fragment wurde nach der Agarosegelelektrophorese unter UV-Licht (354 nm) visualisiert, ausgeschnitten und in einer vom Hersteller empfohlenen Menge Gel Solubilizer S 10 min bei 50°C inkubiert. Nach dem vollständigen Lösen der Agarose wurde der Ansatz mit Binding Enhancer, welcher die für die Bindung an die Silikagelmembran

erforderlichen Bedingungen einstellt, versetzt. Die DNA-haltige Lösung wurde nach Mischen auf die Silikagelmembran einer Zentrifugationssäule pipettiert. Nach kurzer Inkubation erfolgte eine einminütige Zentrifugation bei ~12000 rpm nach welcher der Durchfluss verworfen wurde, die DNA aber an der Membran gebunden vorlag. Ein zweifaches Waschen der Membran mit jeweils 500 µl ethanolhaltigem Waschpuffer reinigte die DNA von möglichen Salzkontaminationen. Nach jeder Waschpufferzugabe wurde der Ansatz zentrifugiert (1 min bei 13000 rpm) und der Durchfluss verworfen. Eine finale Zentrifugation bei 13000 rpm für 4 min diente zur Entfernung von Pufferresten. Um die DNA aus der Silikagelmembran zu eluieren wurde die Zentrifugationssäule in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Elution erfolgte bei niedriger Salzkonzentration und in basischem Milieu durch Zugabe von 25 µl Elutionspuffer und 25 µl ddH₂O. Nach einer Inkubationszeit von 1 min bei Raumtemperatur wurde die DNA durch einen abschließenden einminütigen Zentrifugationsschritt bei ~13000 rpm eluiert. Um evtl. verbliebene Ethanolspuren vollständig zu entfernen, wurde eine Zentrifugation im Vakuum (Speed Vac, 5 min) angeschlossen.

3.3.2 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Lösung erfolgte über den „QIAquick PCR Purification Kit“ der Firma Qiagen, Hilden/D. Die Methode entspricht im Wesentlichen der Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen (s. 3.3.1). Im Unterschied zu der oben beschriebenen Isolierung wurde allerdings dem aufzureinigendem DNA-Gemisch in einem ersten Schritt das fünffache Volumen des Bindepuffers PBI zugegeben, um die für die folgende Aufreinigung erforderlichen Bedingungen einzustellen. Nach zweimaligem waschen mit Puffer PE erfolgte die Elution entsprechend der Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.

3.4 Transformation rekombinanter Plasmide

3.4.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen

Um klonierte DNA stabil zu erhalten und zu vermehren, wird diese in geeignete Klonierungsstämme transformiert werden. Für die Klonierungen wurden die *E. coli*-Stämme DH5 α und TOP 10 verwendet. Der DH5 α -Bakterienstamm ist in seinen Rekombinationseigenschaften defekt (*recA*), was die Stabilität eingeschleuster Plasmid-DNA erheblich erhöht. Ferner ist er in seinen Restriktionssystemen defizient (*mcrA*, *mcrB*, *mmr*), wodurch die Transformationseffizienz deutlich gesteigert wird. Voraussetzung für die Aufnahme von DNA ist, dass die Zellen kompetent sind, wobei die Transformationseffizienz entscheidend vom Kompetenzgrad der Rezipienten abhängig ist.

Für die Präparation kompetenter Bakterienzellen wurden 50 ml SOB-Medium mit 0,5 ml einer gut gewachsenen Übernachtskultur in einem 500 ml Erlenmeyerkolben mit Schikane beimpft und über Nacht bei 25°C und 200 UpM auf dem Schüttler inkubiert. Nach Erreichen einer optischen Dichte OD₅₈₈ von 0,4 - 0,6 wurden die Zellen für 10 min auf Eis gekühlt und in vorgekühlten Greiner Röhrchen für 6 min bei 4°C und 3000 rpm pelletiert. Um die notwendigen Pufferbedingungen bereitzustellen wurde das Z-competent *E. coli* Buffer Set verwendet (Zymo Research, USA). Die Pellets wurden in jeweils 5 ml eisgekühltem Waschpuffer (1x) resuspendiert und erneut pelletiert (s.o.). Nach Resuspendieren der Pellets in eisgekühltem Kompetenzpuffer (1x) wurden die Zellen zu jeweils 100 μ l in vorgekühlte Eppendorfgefäße aliquotiert und bei -70°C gelagert.

3.4.2 Transformation von Bakterien mit rekombinanten Plasmiden

Voraussetzung für die Vermehrung von klonierten DNA-Fragmenten ist der Einsatz von Plasmiden, die sich episomal in Bakterien vervielfachen können und die über ein Antibiotikaresistenzgen als Selektionsmarker verfügen. In Abhängigkeit von der Auswahl des Vektors ist eine nachfolgende Selektion der Transformanten auch über Blau-Weiß-Screening möglich. Eine im β -Galactosidase (α -Fragment) Gen vorhandene Multiple Klonierungsstelle (MCS) ermöglicht die Integration zu klonierender DNA-Fragmente. Durch die Insertion in die MCS wird die Expression der β -Galaktosidase verhindert. Das Enzym β -Galaktosidase hydrolysiert X-Gal zu Galaktose und 5-Brom-4-Chlor-Indoxyl, welches durch den Sauerstoff

der Luft zum tiefblauen 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-Indigo-Farbstoff oxidiert. Wird X-Gal nicht mehr gespalten, kann der blaue Farbstoff nicht entstehen. Transformanten sind somit als weiße Klone zu erkennen.

Die Transformation (26, 50) von kompetenten Bakterienzellen (DH5 α) erfolgte in einem Volumen von 50 μ l oder 100 μ l. Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut, in ein Polypropylen-Röhrchen überführt und mit 2,5 μ l bis 5 μ l der zu transformierenden DNA gemischt. Nach 20 minütiger Inkubation auf Eis wurden geeignete Mengen des Transformationsansatzes auf LB-Selektionsmedium (100 μ g/ml Amp, 50 μ g/ml Kan) ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Die One Shot® TOP 10 kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 2 μ l des TOPO TA cloning Ligationsansatzes versetzt (s. 3.2.6). Nach vorsichtigem Vermischen wurden die Ansätze für 20 min auf Eis inkubiert. Durch einen anschließenden 30 sec Hitzeschock bei 42°C wurde die Aufnahme der Plasmide in die Bakterien ermöglicht. Nach Zugabe von 250 μ l SOC-Medium und einer weiteren Inkubation für 1h bei 37°C konnten die transformierten Bakterien auf Selektionsmedium ausplattiert werden. Auf die LB-Platten wurde zuvor 50 μ l X-Gal (40 μ g/ μ l) ausplattiert und diese für 20 min im Brutschrank bei 37°C präinkubiert.

3.4.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Durch den Einsatz von Vektoren lässt sich rekombinante DNA einfach und effizient vermehren (s. 3.4). In Abhängigkeit von der gewünschten Reinheit der zu erhaltenen DNA wurde die Aufreinigungsmethode gewählt. Sollte das Plasmid durch Gelelektrophorese (s. 3.5.1) und Restriktionsanalyse (s. 3.2.1) hinsichtlich des klonierten DNA-Fragmentes untersucht werden, wurde alkalische Lyse und Ethanolpräzipitation kombiniert eingesetzt (s. 3.4.3.2). Diese Methode gewährleistet aber keine gänzlich saubere Präparation der DNA, sodass die für die Sequenzierung (s. 3.4.5), Yeast Two Hybrid (s. 3.7) oder den Replikationsassay (s. 3.6), eingesetzte DNA über eine Silikagelmembran aufgereinigt wurde (s. 3.4.3.3).

3.4.3.1 Bakterielle Vermehrung in Flüssigkultur

Von den nach der Transformation auf Selektionsmedium angewachsenen Bakterienkolonien wurden mit einer ausgeglühten Impföse eine Kolonie abgenommen und in 5 ml LB-Flüssigmedium, das ebenfalls ein geeignetes Antibiotikum zur Selektion enthielt, resuspendiert. Die Inkubation der Kulturen erfolgte schüttelnd über Nacht bei 37°C. Von der Kultur wurde anschließend 1 ml durch eine Zentrifugation bei 11000 rpm für 10 min in einer Tischzentrifuge pelletiert und der Überstand verworfen. Die Pellets konnten für eine spätere Aufarbeitung bei -20 °C eingefroren werden.

3.4.3.2 DNA-Präparation durch alkalische Lyse und Ethanol-fällung

Die nach der Vermehrung der *E. coli* DH5 α Zellen in Flüssigkultur pelletierten Zellen wurden zunächst in 100 μ l Puffer P1 resuspendiert und anschließend mit 100 μ l Puffer P2 versetzt, der SDS und NaOH enthält. Dabei vermittelt das Detergens SDS sowohl die Lyse der Zellen und somit die Freisetzung des Zellinhaltes als auch die Denaturierung der Proteine. Das NaOH trägt ebenfalls zur Denaturierung der Proteine bei. Zusätzlich wird NaOH für die Denaturierung sowohl chromosomaler und Plasmid-DNA benötigt. Nach einer Zugabe von 250 μ l Neutralisierungs-Puffer N3 konnten denaturierte Proteine, Zelltrümmer und chromosomale DNA als Salz-Detergens-Komplexe durch einen Zentrifugationsschritt von 10 min bei 13000 rpm präzipitiert werden. Der Überstand wurde sorgfältig abgenommen und zur Fällung plasmidaler DNA mit 1 ml abs. Ethanol (p. a.) versetzt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das DNA-Pellet einmal mit 70%igem Ethanol gewaschen, um einen Teil der Salzkontaminationen zu entfernen. Nach einer abschließenden Zentrifugation wurde die DNA in der SpeedVac getrocknet und in 50 μ l TE-Puffer resuspendiert.

3.4.3.3 DNA-Präparation durch Adsorption an Silikagelmembran

Die Isolierung von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab wurde mit dem „QIAprep® Miniprep“-Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Die Anzucht der Bakterien in Flüssigmedium und die darauf folgende alkalische Lyse erfolgte wie oben beschrieben (s. 3.4.3.1). Nach dem Zentrifugationsschritt von 10 min bei 13000 rpm wurde die Plasmid-DNA im Überstand sorgfältig abgenommen und direkt auf die QIAprep Säulen pipettiert. Durch einen kurzen

Zentrifugationsschritt adsorbiert die Plasmid-DNA an die Membran, während RNA, zelluläre Proteine und Metaboliten ungebunden vorliegen. Durch zwei aufeinanderfolgende Waschschrte mit dem ethanolhaltigen Puffer PE wurde die DNA auf der Membran von anhaftenden Salzen befreit und nachfolgend mit 25 µl Puffer EB und 25 µl Wasser eluiert. Es schloss sich eine fünfminütige Vakuumbehandlung an, um evtl. verbliebene Ethanolreste zu entfernen.

Die quantitative Kontrolle der Plasmidisolierung erfolgte über fluorometrische Bestimmung (s. 3.4.4.2). Die rekombinante DNA wurde über Restriktionsverdau (s. 3.2.1) und nachfolgende Sequenzierung (3.4.5) analysiert.

3.4.3.4 DNA-Präparation über Anionenaustauschersäulen

Präparationen größerer Mengen an Plasmid-DNA wurden mit Hilfe des „Maxi-Präparations-Kits“ der Firma Qiagen durchgeführt. Die Anzucht der Bakterienkulturen erfolgt wie oben beschrieben und die Isolierung der plasmidalen DNA basiert, wie bereits unter 3.5.3.2 beschrieben, auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Die Plasmid-DNA wird hierbei unter Niedrigsalzbedingungen und bei einem pH-Wert von 5,5 an eine Anionenaustauschersäule gebunden, gewaschen und anschließend unter Hochsalzbedingungen eluiert.

Im Anschluss an den Neutralisationsschritt erfolgte eine Zentrifugation (20000 g, 30 min, 4°C), nach welchem der Plasmid-DNA-haltige Überstand abgenommen und auf eine „QIAGEN-Säule“ (QIAGEN-tip 500) gegeben wurde. Diese Säule wurde zuvor mit 10 ml Puffer QBT äquilibriert (das enthaltene Detergens Triton X-100 bewirkt eine Reduktion der Oberflächenspannung und ermöglicht damit den Durchfluss ohne Anlegen eines Druckes oder Vakuums). Die gebundene DNA wurde durch zwei aufeinanderfolgende Waschschrte mit jeweils 30 ml Puffer QC von RNA, Proteinen und Metaboliten befreit. Die Elution erfolgte im Anschluss in Gegenwart hoher Salzkonzentration durch Applikation von 15 ml Puffer QF. Durch Zugabe von 0,7 Vol. % Isopropanol p.a. wurde die DNA präzipitiert, anschließend durch Zentrifugation pelletiert (20000 g, 30 min, 4°C), mit 70 % Ethanol gewaschen und nach Trocknen an der Luft in 0,5 ml Puffer EB aufgenommen.

Die Konzentration der DNA wurde anschließend spektrometrisch am NanoDrop ND-1000 (s. 3.4.4.2) oder über Agarosegelelektrophorese (s. 3.4.4.1) bestimmt.

3.4.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

3.4.4.1 Konzentrationsbestimmung mittels Agarosegel

Die Konzentrationsbestimmung von isolierter DNA, einzelnen DNA-Fragmenten sowie RNA ist für weitere Versuchsdurchführungen essentiell. Eine Möglichkeit, geringe Mengen an Nukleinsäure zu quantifizieren, bietet das Agarosegel (s. 3.5.1). Dessen Nachweisgrenze liegt bei etwa 5 ng DNA pro Bande. Hierbei wird neben den Proben ein Längenstandard bekannter Konzentration mit aufgetragen.

Zum Zwecke der Konzentrationsbestimmung wurden jeweils 5,0 µl der DNA-Lösung mit 2,0 µl TE-Puffer und 2,0 µl Probenpuffer versetzt und über ein Agarosegel geeigneter Porengröße aufgetrennt. Als DNA bekannter Konzentration wurde mit *Hind* III geschnittene DNA des Phagen λ (150 ng/µl), mit *Hae* III geschnittene DNA des Phagen ϕ X174 (150 ng/µl) oder der 100 bp DNA ladder (150 ng/µl) verwendet. Dabei sind jeweils 2,0 µl der angeführten Größenmarker-Lösungen mit 2,0 µl TE-Puffer und 2,0 µl Probenpuffer versetzt, gemischt und neben der Probe unbekannter Konzentration auf das Gel aufgetragen worden.

3.4.4.2 Konzentrationsbestimmung mittels Absorptionsspektrometrie

Die Konzentrationsbestimmung erfolgt über die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm. So entspricht eine OD₂₆₀ von 1 ungefähr einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 40 µg/ml RNA, 33 µg/ml einzelsträngiger DNA und etwa 20 µg/ml bei Oligonukleotiden. Aus dem Verhältnis der OD₂₆₀ und OD₂₈₀ erhält man eine Aussage über Proteinkontaminationen in der Lösung. Ethanol und die aromatischen Aminosäuren von Proteinen besitzen bei 280 nm ein Absorptionsmaximum, so dass der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ bei deren Vorhandensein abnimmt. Als optimal gilt ein Wert von 1,8 für DNA-Lösungen. Die Extinktion bei einer Wellenlänge von 230 nm gibt Auskunft über weitere Verunreinigungen z.B. mit Polysacchariden.

Die Konzentrationsbestimmungen wurden am NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer durchgeführt. Bei diesem Gerät wird eine 2 µl Probe durch Oberflächenspannung in einer Glasfaseroptik gehalten und photometrisch vermessen. Mit Hilfe der zugehörigen Software wird anhand einer vorhergehenden Null-Kalibrierung mit dem reinen Lösungsmittel die DNA-Konzentration in ng/µl berechnet und Werte für die Quotienten OD₂₆₀/OD₂₈₀ und

OD_{260}/OD_{230} zur Abschätzung der Reinheit angegeben. Reine DNA bzw. RNA besitzt A260/A280-Raten von 1,7 - 2,0 bzw. 1,9 - 2,1.

3.4.5 Sequenzierung von Nukleinsäuren

Die DNA-Sequenzierung beschreibt die Bestimmung der charakteristischen Nukleotidabfolge innerhalb eines DNA-Moleküls und wurde nach der Didesoxy-Methode (165) durchgeführt. Diese Methode basiert auf der enzymatisch katalysierten Synthese einer Population von basenspezifisch terminierten DNA-Fragmenten, die nach ihrer Größe elektrophoretisch im Gel oder einer Kapillare aufgetrennt werden können. Diese Methode wird als Zyklussequenzierung bezeichnet. Dabei wird im Gegensatz zur Standard PCR nur ein Primer verwendet, wodurch man die Amplifikation von Einzelsträngen erreicht.

Ausgehend von einer einzelsträngigen Matrizen-DNA mit einer Primererkennungsregion und durch Zugabe eines mit dieser Sequenz komplementären Primers, eines Nukleotidgemisches und einer DNA-Polymerase wird die Synthese eines komplementären DNA-Stranges initiiert. Neben den dNTPs werden Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTP) verwendet (sog. Terminatoren), denen die Hydroxylgruppe am 3'-C-Atom fehlt. Da in der Folge keine Phosphorsäurediester-Bindung zwischen dem neu hinzukommenden Nukleotid und dem Ende des wachsenden Stranges geknüpft werden kann, kommt es zum Abbruch der Reaktion. Man bezeichnet die Sanger-(Didesoxy) Methode deshalb auch als Kettenabbruch-Methode.

Im Falle der nichtradioaktiven Sequenzierung werden fluoreszenzmarkierte ddNTPs (Big Dye-TerminatorenTM) eingesetzt.

<i>Beispiel-Pipettierschema</i>	
1,0 µl	sequenzspezifische Primer (10 µM)
1,0 µl	Premix
150 ng - 300 ng	Plasmid-DNA

Dieses Verfahren hat den Vorteil, die benötigte Matrizenmenge deutlich zu reduzieren. Zudem lassen sich durch den Einsatz höherer Temperaturen auch hartnäckige Sekundärstrukturen und GC-reiche Sequenzen wesentlich besser überwinden.

Die PCR erfolgte unter nachstehenden Bedingungen im computergesteuerten Thermostaten:

<i>Sequenzierung - PCR Programm</i>		
Zeit	Temperatur	
2 min	96°C	25x
10 sek.	96°C	
5 sek.	60°C	
4 min	60°C	

Die weitere Aufarbeitung sowie Auftrennung der Proben durch einen DNA-Kapillar-Sequenzierautomaten (ABI PRISM™ 3100 Genetic Analyzer) erfolgte als Serviceleistung des Sequenzierlabors des Robert Koch-Institutes. Bei der Kapillarsequenzierung wird die Auftrennung der unterschiedlich langen Sequenzierungsprodukte in einer Kapillare, die mit einem speziellen Polymer gefüllt ist, unter sehr hohen Spannungen erreicht. Nach der Auftrennung erfolgt eine Anregung der vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe über Laserabtastung. Die emittierten Farbsignale werden über Filter mit vier verschiedenen Wellenlängen in einen Fotomultiplier geleitet und mit Hilfe eines Computers in die entsprechende Nukleotidsequenz übersetzt. Das Ergebnis der Sequenzierung wurde jeweils als Computerdatei erhalten und konnte mittels verschiedener Computerprogramme ausgewertet werden.

3.5 Elektrophorese

Die Elektrophorese ist eine Methode um Proteine oder Nukleinsäuren zu analysieren. Dabei erfolgt die elektrophoretische Auftrennung in einem festen Trägermaterial, welches sowohl Agarose als auch Polyacrylamid sein kann. Die Wahl des Trägermaterials hängt von der Größe und der Art der zu analysierenden Substanz ab.

3.5.1 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Methode zur elektrophoretischen Auftrennung von Nukleinsäuren oder Proteinen. Hierbei wird das Laufverhalten der DNA im Agarosegel von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Zum einen ist zu beachten, dass die effektive Größe der

Nukleinsäuremoleküle nicht nur von ihrer absoluten Masse, sondern auch von ihrer Form abhängt: superhelikal, offen, doppelsträngig linear oder einzelsträngig. Zum anderen sind Agarosekonzentration, angelegte Spannung, Art des Laufpuffers sowie die Anwesenheit interkalierender Farbstoffe für das Laufverhalten der DNA im Agarosegel ausschlaggebend. Nukleinsäuren sind innerhalb eines sehr großen pH-Bereiches stets negativ geladen, sodass die Auftrennung im elektrischen Feld in Richtung Anode erfolgt. Um die Nukleinsäure im Gel zu lokalisieren wird diese mittels eines geeigneten Farbstoffes visualisiert. Während der vorliegenden Arbeit wurden zwei Fluoreszenzfarbstoffe verwendet. Sowohl Ethidiumbromid (EtBr) als auch das zum Ende der Arbeit verwendete GelRed™ der Firma Biotium (Hayward, CA) interkalieren in dsDNA, welche daraufhin im UV-Licht (254 - 366 nm) sichtbar dargestellt werden kann.

Zur Charakterisierung der Fragmentgrößen werden Längenstandards (Marker), welche DNA-Fragmente genau definierter Größe enthalten, zusammen mit der zu analysierenden Probe in einem Agarosegel aufgetrennt.

Die Auswahl der Agarosekonzentration erfolgte in Abhängigkeit von der zu erwartenden Fragmentgröße. So wurden DNA-Fragmente mit bis zu 600 bp in 2%igem, größere Produkte in 0,7 - 1,5%igem Agarosegel aufgetrennt. Hierzu wurde die Agarose in 100 ml 2x TBE-Puffer, dem bereits das Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,4 µg/ml bzw. GelRed in einer Verdünnung von 1:20000, bereits zugesetzt worden war, durch Erhitzen vollständig gelöst, anschließend auf ca. 56°C abgekühlt und in eine horizontale Gelkammer gegossen. Nach Zugabe von 0,1 Volumen 10fach konzentriertem Agarosegel-Probenpuffer wurden die Proben in Geltaschen pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 2x TBE als Laufpuffer bei konstanter Spannung (~100 mA).

3.5.2 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Die Polyacrylamidgele sind chemisch inert und besonders stabil. Die Elektrophorese in Polyacrylamidgelen wird je nach Anwendungsgebiet nativ oder denaturierend durchgeführt. Nicht-denaturierende Gele werden u.a. zur Analyse von DNA-Protein-Komplexen verwendet, während denaturierende Polyacrylamidgele im Gegensatz dazu eine sehr genaue Auftrennung einzelsträngiger DNA- bzw. RNA-Moleküle ermöglichen und daher bei Sequenzierungen, zur Analyse von S1-Nuclease-Reaktionsprodukten sowie RNase-Protektionsexperimenten verwendet werden.

3.5.2.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist eine analytische Methode zur Auftrennung von Proteinen und anderen Makromolekülen in einem elektrischen Feld.

SDS (Natriumdodecylsulfat) ist ein anionisches Detergenz und überdeckt die Eigenladungen von Proteinen so effektiv, dass Micellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit entstehen (ca. 1,4 g SDS pro g Protein).

Die Proben werden vor dem Auftragen mit einem Überschuss an SDS versetzt und auf 95°C erhitzt, um durch Aufspalten der Wasserstoffbrücken Tertiär- und Sekundärstrukturen aufzubrechen. Schwefelbrücken zwischen den Cysteinen werden durch die Zugabe reduzierender Thiolverbindungen, z.B. β -Mercapthoethanol aufgespalten. Die somit gestreckten und mit SDS beladenen Aminosäureketten bilden Ellipsoide.

Die Protein:SDS-Komplexe wandern während der Elektrophorese zur Anode. Lässt man Eichproteine mitlaufen, so kann man die M_r der unbekannt Proteine bestimmen. Im eingesetzten Molekulargewichtsmarker (Precision Plus Protein™ Standards) sind Proteine von 250 kDa bis 10 kDa enthalten.

Für die Herstellung des kombinierten Gelsystems wird das Trenngel zwischen zwei Glasplatten gegossen, mit Butanol überschichtet, um eine gerade Trennlinie zu erhalten, und nach Entfernen des Alkohols mit Sammelgel überschichtet. Geeignete Taschen zur Aufnahme der Proben wurden durch Einsetzen eines Elektrophoresekammes in die noch flüssige Lösung geschaffen.

Zur Durchführung der SDS-PAGE wurden 10 μ l des in vitro Expressionsansatzes mit 10 μ l Probenpuffer versetzt, vorsichtig gemischt und für 2 min bei 95°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die vorbereiteten Proben und 5 μ l des Molekulargewichtsmarkers in die Geltaschen pipettiert, bevor die elektrophoretische Auftrennung in einer Mighty Small-Gelkammer (Hoefer Scientific Instrument, San Francisco/USA) über ein denaturierendes Gelsystem durch Anlegen einer konstanten Spannung und einer Stromstärke von 15 mA pro Gel gestartet wurde.

<i>Denaturierendes Gel</i>	
<u>Trenngel (10 %)</u>	<u>Sammelgel (5 %)</u>
7,50 ml Trenngelpuffer	2,50 ml Sammelgelpuffer
10,00 ml Acrylamid (30 %)	3,30 ml Acrylamid (30 %)
11,90 ml ddH ₂ O	13,70 ml ddH ₂ O
0,30 ml SDS (10 %)	0,20 ml SDS (10 %)
0,12 ml APS (10 %)	0,12 ml APS (10 %)
0,04 ml TEMED	0,04 ml TEMED

3.6 Replikationsassay

Die Vervielfältigung des Erbinformatinsträgers wird als Replikation bezeichnet. Dabei wird der Abschnitt, welcher einen Replikationsursprung und eine Sequenz besitzt, welche die Termination der Replikation vermittelt, als Replikon bezeichnet. Um die Replikation zu initiieren ist neben dem Replikationsursprung, der auch als *in cis* aktives Element bezeichnet wird, ein *in trans* aktives Element erforderlich. Die *in trans* agierenden Replikationsfaktoren müssen nicht notwendigerweise auf demselben DNA-Abschnitt lokalisiert sein.

Um plasmidale Replikation in eukaryoten Zellen zu gewährleisten, müssen einerseits ein geeignetes *in cis* Kontrollelement sowie andererseits die entsprechenden *in trans* agierenden Replikationsfaktoren zur Verfügung stehen (Abb. 3-3).

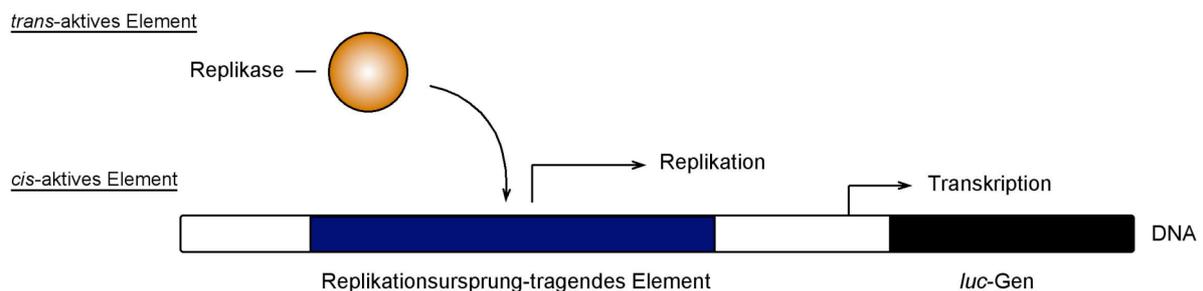
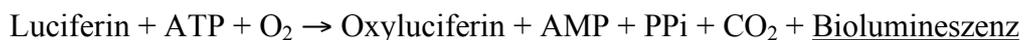


Abbildung 3-3: Model des Replikationsassay. Durch Bindung der Replikase an den Replikationsursprung wird Replikation initiiert. Die Transkription des Reportergens *luc* wird durch einen basalen Promotor gewährleistet.

Zur Ermittlung der Replikationskomponenten des humanen TTV wurden die beiden Kontrollelemente, die Replikase und die DNA mit Replikationsursprung, lokalisiert auf unterschiedlichen Plasmiden, durch Kotransfektion (s. 3.9.4) in mammale Zellen gebracht. Beide Plasmide tragen einen bakteriellen Replikationsursprung, um die Amplifizierung der Plasmid-DNA in Bakterien zu gewährleisten (s. 3.4.3.1), aber kein Kontrollelement spezifisch für eukaryotische Replikation. Replikation wird in den Zellen demzufolge lediglich durch die Anwesenheit des viralen Replikationsursprunges gewährleistet, sofern die viralen Replikationsfaktoren zur Verfügung stehen.

Auf dem Plasmid mit Replikationsursprung war zusätzlich das Luziferasegen (*luc*) als Reportergen lokalisiert, dessen Transkription durch einen basalen Promotor gewährleistet wird. Die Replikation des *luc*-Plasmides und damit auch des *luc*-Gens wird über die Luc-Aktivität quantifiziert. Luziferase, ein Enzym von 61 KDa, katalysiert in Gegenwart von molekularem Sauerstoff und unter ATP-Verbrauch die biolumineszente Oxidation von Luciferin zu Oxyluciferin.



Das beteiligte Enzym ist nur als vollständiges Produkt aktiv und bedarf für seine Aktivität keiner posttranslationalen Modifikationen. Die Quantifizierung der Lichtemission in den Zelllysaten ist somit ein indirektes Maß für Replikationsaktivität des Reportergenplasmides in den kotransfizierten Zellen.

Der eigentliche Luziferasenachweis erfolgte in einem Luminometer mit automatischer Injektion des Luziferaseassay-Reagenzes.

3.6.1 Biolumineszenz-Assay zur quantitativen Bestimmung der Luziferase-Aktivität

Die Bestimmung der Reportergenaktivität erfolgte über das „Tropix® Dual-Light® luminescent reporter gene assay system“ (Applied Biosystems, Bedford/USA) in einem Luminometer. Das System erlaubt neben der Detektion der Luziferaseaktivität die nachfolgende Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität innerhalb des gleichen Zellextraktes hinsichtlich einer Normalisierung der Transfektionseffizienz. Die Zelllysate wurden mit Puffer A gemischt und nach Substratzugabe über Puffer B die Luziferaseaktivität vermessen. Aufgrund der Abwesenheit von Enhancer und des geringen pH-Wertes (pH 7,8) der Reaktion

sind aus einer β -Galaktosidaseaktivität resultierende Signale zu vernachlässigen. Nach einer entsprechenden Inkubationszeit wird die β -Galaktosidase/Galakton-Plus® Substratreaktion durch Zugabe von Accelerator-II initiiert, welcher einerseits den pH-Wert erhöht (pH 9), andererseits den Lumineszenzenhancer zur Verfügung stellt. Verbleibende Luziferaseaktivität ist aufgrund des quenching-Effektes von Accelerator-II und des raschen kinetischen Zerfalls der Reaktion zu vernachlässigen. Endogene Enzymaktivität (β -Galaktosidaseaktivität) wird unter den gegebenen Reaktionsbedingungen (pH 9) reduziert.

Nach Verdünnen des Substrates Galakton-Plus in Puffer B (1:100) wurde das Luminometer mit 70 % Ethanol (100x), ddH₂O (100x) und Substratlösung (20x) gespült. In einer Mikrotiterplatte wurden 25 μ l Puffer A (Raumtemperatur) mit jeweils 10 μ l Zellextrakt gemischt und sofort vermessen. Die Injektion der Substratlösung (100 μ l) erfolgte automatisch. Die Mikrotiterplatte wurde nachfolgend für 45 min im Dunkeln inkubiert und nach Spülen des Luminometers mit ddH₂O (50x) und Accelerator (20x) die β -Galaktosidaseaktivität in den Zellextrakten durch automatische Injektion des Accelerators (100 μ l) bestimmt.

3.7 Yeast Two-Hybrid: MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3

Das Two Hybrid-System (auch *interaction trap* genannt) weist Protein-Protein-Wechselwirkungen in intakten Zellen nach. Es basiert auf der biologischen Wirkung eukaryotischer Transkriptionsfaktoren, welche im Wesentlichen aus zwei Strukturdomänen, die auch den Funktionsdomänen entsprechen, aufgebaut sind. Über die sogenannte DNA-Bindedomäne (DNA-BD) interagiert der Transkriptionsfaktor mit Upstream-Aktivatorsequenzen (UAS) der DNA und gewährleistet somit die räumliche Nähe zu einer Transkriptionseinheit oder einem Promotor. Diese Bindung ist notwendig, aber nicht hinreichend für eine Funktion des Transkriptionsfaktors. Erst eine Zweite, die sogenannte Aktivierungsdomäne (AD), vermittelt nachfolgend die Transkription über Kontakt mit dem basalen Transkriptionsapparat (Abb. 3-4). Die Spezifität der Aktivierung der Transkription wird dabei einzig durch die DNA-Bindedomäne und somit über die Interaktion mit spezifischen Promotorsequenzen garantiert. Durch eine Trennung der Aktivierungsdomäne von der DNA-Bindedomäne wird die Funktion des Transkriptionsfaktors aufgehoben, kann

aber durch enge räumliche Assoziation beider Funktionseinheiten wieder gewährleistet werden. Das „MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3“ bedient sich der funktionalen Komplementarität und Modularität des Transkriptionsfaktors GAL4 in Hefe Schreibweise ändern/hört sich wie beschrieben an (36) zur Detektion von Protein:Protein-Wechselwirkungen. Hierbei wird der Transkriptionsfaktor GAL4 (GAL4 DNA-BD und GAL4 AD) aus *Saccharomyces cerevisiae* eingesetzt. Über die Interaktion dieses Transkriptionsfaktors mit drei heterologen UAS und Promotorelementen innerhalb des Genoms des Hefestammes AH109 wird die nachfolgende Transkription der Reportergene HIS3, ADE2 und MEL1/lacZ reguliert. Durch die Konstruktion geeigneter Plasmide, welche die Expression eines GAL4 DNA-BD-Fusionsproteins einerseits und die Expression eines GAL4 AD-Fusionsproteins andererseits nach Transfektion in geeigneten Hefezellen (AH109) erlauben, lassen sich unterschiedliche Proteininteraktionen identifizieren. Die Interaktion der beiden Fusionsproteine schafft die indirekte Voraussetzung für die Funktion des Transkriptionsfaktors, d.h. Kopplung der für die Funktion notwendigen Module und lässt sich über Expression der entsprechenden Reportergene verifizieren.

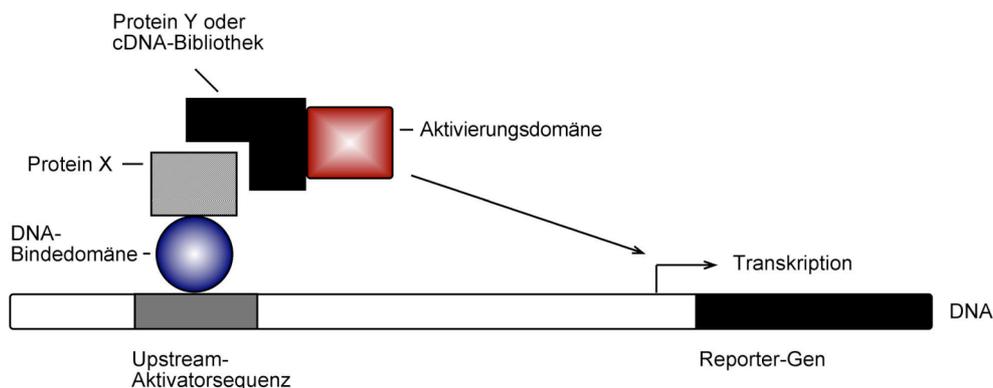


Abbildung 3-4: Prinzip des Two-Hybrid Systems. Werden die funktionalen Untereinheiten eines Transkriptionsfaktors getrennt als Fusionsproteine exprimiert, kann die Funktion des Faktors (Initiation der Transkription) wiederhergestellt werden, wenn die Fusionsproteine über die zusätzlichen Proteinanteile interagieren.

3.7.1 Transformation kompetenter Hefezellen

Die Transformation kompetenter Hefezellen erfolgte nach den Angaben des Herstellers, wobei sich die Protokolle hinsichtlich des Maßstabes der Transformation unterschieden (s. Tab.:3-2). Die DNA-BD und AD-Fusionsvektoren (pGBKT7 und pGADT7) des „MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3“ gewährleisten die Expression heterologer Proteine als Gal4-Fusionen mit c-Myc-(pGBKT7) oder HA-(pGADT7) Epitop-Tag. Beide Vektoren kodieren zusätzlich einen pUC-Replikationsursprung, exprimieren unterschiedliche bakterielle Selektionsmarker (pGBKT7: Kanamycin, pGADT7: Ampicillin) und bieten die Möglichkeit der *in vitro* Transkription/Translation über einen T7-Promotor stromabwärts der Gal4 kodierenden Sequenzen.

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

Tabelle 3-1: Pipettierschemata für das „Yeast Two Hybrid“-System

	Transformationsmaßstab	
	Klein	Mittel
DNA-BD-Plasmid	0,1 µg	20 - 100 µg
DNA-AD-Plasmid	0,1 µg	10 - 50 µg
carrier DNA	0,1 mg	2 mg
kompetente Hefezellen	0,1 ml	1 ml
PEG/LiAc-Lösung	0,6 ml	6 ml
DMSO	70 µl	700 µl
YPDA	0,5 ml	1,0 ml

3.7.2 Herstellung kompetenter Hefezellen

Für die Herstellung kompetenter Zellen wurde der Hefestamm AH109 verwendet, welcher durch die Expression dreier Reportergene (ADE2, HIS3, MEL1/lacZ) unter Kontrolle heterologer Gal4 sensitiver UAS und Promotorelemente (GAL1, GAL2, MEL1) die Eliminierung falsch positiver Interaktionen gewährleistet.

GAL1 UAS	GAL1 TATA	<i>HIS3</i>
GAL2 UAS	GAL2 TATA	<i>ADE2</i>
MEL1 UAS	MEL1 TATA	<i>lacZ</i>

Abbildung 3-5: Reportergenkonstrukte im Hefestamm AH109. Der Hefestamm ist ein Derivat des Stammes PJ69-2A und schließt die Marker ADE2 und HIS3 mit ein. Die HIS3, ADE2 und MEL1/lacZ Reportergene stehen unter der Kontrolle von 3 komplett heterologen GAL4-responsive UAS und den Promotorelementen GAL1, GAL2 sowie MEL1.

Während die Expression der Reportergene ADE2 bzw. HIS3 (70) das Wachstum auf Adenin bzw. Histidin defizientem Selektionmedium erlaubt, wird über α - bzw. β -Galaktosidaseexpression (MEL1 bzw. lacZ) eine Blau-Weiß-Selektion ermöglicht.

Für die Präparation kompetenter Hefezellen wurde eine frisch gewachsene Hefekolonie (2 - 3 mm) in 1 ml YPDA-Medium durch Vortexen vollständig resuspendiert. Je nach Transformationsmaßstab (s. Tab.:3-3) wurde eine entsprechende Menge YPDA-Medium im Erlenmeyerkolben mit diesem Inokulum beimpft und bis Erreichen einer $OD_{600} > 1,5$ bei 30°C und 250 UpM auf dem Schüttler inkubiert (16 - 18 h). Frisches YPDA-Medium wurde mit der Übernachtskultur beimpft ($OD_{600} = 0,2 - 0,3$) und für 3 h bei 30°C und 250 rpm auf dem Schüttler inkubiert ($OD_{600} = 0,5 \pm 0,1$). Nach Zentrifugation für 5 min bei 1000 x g und Raumtemperatur wurden die Pellets in sterilem TE-Puffer resuspendiert, gegebenenfalls vereinigt und erneut bei 1000 x g für 5 min abzentrifugiert. Nach Resuspendieren der Zellpellets in sterilem TE/LiAc wurden die kompetenten Hefezellen bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Tabelle 3-2:

	Transformationsmaßstab	
	Klein	Mittel
YPDA Übernachtkultur	50 ml	50 ml
YPDA 3 h-Kultur	300 ml	300 ml
TE-Puffer	50 ml	50 ml
TE/LiAc	1,5 ml	1,5 ml

3.8 Immunopräzipitation (IP)

Die Immunopräzipitation beschreibt die Immobilisierung von löslichem Antigen durch Präzipitation mit spezifischen Antikörpern. Der Verlust der Löslichkeit der Antigen-Antikörper-Komplexe wird durch Zugabe unlöslicher Partikel erreicht, die wiederum spezifisch die verwendeten Antikörper komplexieren (Abb. 3-5).

Durch die Koimmunopräzipitation können Protein:Protein-Interaktionen möglicher Interaktionspartner nachgewiesen werden. Um sowohl die homologe als auch die heterologe Interaktion viraler Proteine von TTV über die Koimmunopräzipitation zu untersuchen, wurden die Proteine als N-terminale c-Myc- und HA-Fusionsproteine *in vitro* exprimiert.

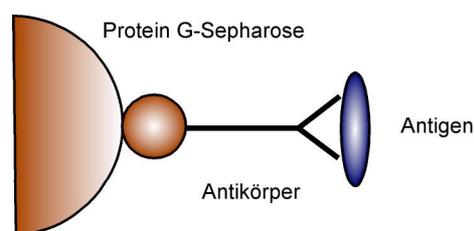


Abbildung 3-6: Model des Protein G-Sepharose gekoppelten Antigen-Antikörper-Komplexes.

3.8.1 Induktion der Protein:Protein-Interaktion

Die Expression der viralen Proteine von TTV erfolgte *in vitro* (TNT[®] T7 Coupled Wheat Germ Extract System) als N-terminale c-Myc- und HA-Fusionsproteine (s. 3.8.8). Die Ausbildung einer potentiellen homologen bzw. heterologen Interaktion der viralen Proteine wurde durch die Vereinigung jeweils zweier *in vitro* exprimierter Fusionsproteine induziert.

Dabei wurden jeweils 40 µl des c-Myc-Fusionsproteins mit 40 µl des HA-Fusionsproteins vereinigt und für 1 h bei 30°C im Brutraum inkubiert.

3.8.2 Bildung des Antigen-Antikörper-Komplexes

Nachdem das Gesamtvolumen durch Zugabe von Waschpuffer auf 500 µl gebracht wurde, erfolgte die Zugabe von 6,6 µl anti-HA Antikörper aus Kaninchen (1:150, Glycerol). Die Proben wurden dann für zwei Stunden bei 4°C auf einem Rotator inkubiert.

3.8.3 Präzipitation des Antigen-Antikörper-Komplexes

Die Präzipitation der löslichen anti-HA-Antigen-Komplexe (s.o.) erfolgte durch Zugabe von jeweils 20 µl Protein-G-Sepharose, die zuvor mit Waschpuffer gewaschen und 1:1 resuspendiert wurde, und erneuter Inkubation bei 4°C für 2 h auf dem Rotator.

Protein-G ist ein Zellwandbestandteil von Bakterien der Gattung *Streptococcus* der Gruppen C und G und besitzt am C-Terminus drei homologe Bindungsdomänen mit hoher Affinität für die Fc-Region von Immunglobulinen des Isotyps IgG vieler mammaler Spezies. Dabei hat die Bindung keinerlei Auswirkung auf die Antigen-Antikörper-Interaktion. Durch niedertourige Zentrifugation für 2 min bei 4000 rpm und 4°C wurden die Komplexe aus Protein G-Sepharose, anti-HA Antikörper und Antigen präzipitiert. Schließlich wurden die Präzipitate drei Mal für 5 min mit eiskaltem Waschpuffer und Inkubation im Kühlraum bei 4°C gewaschen und für 4 min bei 4000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils vorsichtig mit einer Kanüle an der Wasserstrahlpumpe abgezogen. Das Pellet konnte nun bis zur weiteren Analyse bei -20°C eingefroren werden.

3.8.4 Detektion einer Koimmunopräzipitation

Es folgte die Zugabe von jeweils 50 µl SDS-PAGE 1x Probenpuffer und eine fünfminütige Inkubation bei 95°C im Kochwasserbad. Die Detektion einer Koimmunopräzipitation und somit einer Interaktion der Fusionsproteine erfolgte nach Auftrennung über SDS-PAGE (s. 3.5.2.1) durch Detektion der nachfolgend auf einer PVDF-Membran immobilisierten Proteine (s. 3.8.6).

3.8.5 Immuno-/Western Blot

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung in der SDS-PAGE erfolgte die Immobilisierung der Proteine auf eine PVDF-Membran im Western Blot. Dabei wurden Membran und zwei Filterpapieren auf die Gelgröße zurechtgeschnitten. Die Membran wurde aufgrund der Hydrophobizität kurz mit Methanol befeuchtet, mit ddH₂O abgespült und zusammen mit den Filterpapieren und dem Gel in Transferpuffer äquilibriert. Schließlich wurde ein luftblasenfreies Blotsandwich zusammengestellt: In einer horizontalen, semi-trockenen Transferkammer ohne Kühlung wurde eine Lage Filterpapier auf der mit ddH₂O angefeuchteten, anodischen Graphitplatte platziert und mit der Membran, dem Gel und einer weiteren Lage Filterpapier überschichtet. Der Aufbau wurde durch Auflegen der Graphitplatte komplettiert, die ebenfalls zuvor mit ddH₂O angefeuchtet worden war. Nach Aufbau des „Sandwiches“ erfolgte der Transfer mit $\sim 3 \text{ mA pro cm}^2$ Gel für 45 min bei Raumtemperatur.

3.8.6 Färbung membrangebundener Proteine

Bevor die immunologische Detektion der immobilisierten Proteine erfolgte, wurde die PVDF-Membran reversibel gefärbt. Zu diesem Zweck wurde die Membran für ca. 1 min in 5 ml Ponceau S-Färbelösung inkubiert und anschließend mit ddH₂O gewaschen. Nach Abtrennen des Größenmarkers wurde die Membran wie unten beschrieben weiterbehandelt (s. 3.8.7). Der abgetrennte Größenmarker hingegen wurde an der Luft getrocknet und bis zur weiteren Verwendung im Dunkeln gelagert.

3.8.7 Immunologische Detektion membrangebundener Proteine

Nach elektrophoretischem Transfer lassen sich die immobilisierten Proteine auf der Membran durch eine Antikörper-spezifische Enzymreaktion detektieren (47, 149). Der nach primärer Antikörperinkubation ausgebildete Antigen-Antikörper-Komplex wird nach einer nachfolgenden enzymkonjugierten Sekundärantikörperinkubation durch enzymatische Umsetzung eines geeigneten Substrates visualisiert. Bei dem konjugierten Enzym handelte es sich um eine Peroxidase, welche die Oxidation von Luminol (ein zyklisches Diazylhydrazid) in Gegenwart von Wasserstoffperoxid unter Chemilumineszenzentwicklung katalysiert.

Nach Inkubation in Blockpuffer für 2 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurde der Blockpuffer entfernt und die Membran nachfolgend für 1 h bei Raumtemperatur in primärer Antikörperlösung inkubiert. Nach dem Waschen der Membran 3x für jeweils 10 min mit Waschpuffer wurde die Membran mit sekundärer Antikörperlösung inkubiert. Nach 1 h bei Raumtemperatur wurde wiederum 3x für jeweils 10 min gewaschen, mit einer ausreichenden Menge Detektionslösung (0,125 ml/cm²) überschichtet und für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Expositionszeit variiert zwischen 1 min und 25 min.

3.8.8 *In vitro* Proteinexpression

Die Expression der c-Myc- und HA-Fusionsproteine erfolgte *in vitro* mit dem „TNT[®] T7 Coupled Wheat Germ Extract System“, welches die Kopplung von Transkription und Translation eukaryotischer Gene erlaubt. Voraussetzung dabei ist, dass die zu exprimierenden Gene unter Kontrolle des T3-, T7- oder SP6-Promotors stehen. Die Vorteile gekoppelter Systeme, im Gegensatz zu Systemen bei denen Transkription und Translation in getrennten Reaktionen durchgeführt werden, liegen zum einen in einer erheblichen Zeitersparnis, zum anderen in einer Erhöhung der Proteinausbeute. Da die Linearisierung des zirkulären Plasmids die Menge an gebildetem Produkt erhöhen kann, wurden als Matrize für die Expression linearisierte Plasmide verwendet.

Zum Zwecke der *in vitro* Expression wurden 25 µl Weizenkeimextrakt mit 2 µl Puffer, jeweils 0,5 µl Aminosäuremix ohne Methionin bzw. Leucin, 1 µl RNase Inhibitor, 1 µl Polymerase und 1 µg DNA in einem Gesamtvolumen von 50 µl gemischt und für 90 min bei 30°C im Brutschrank inkubiert. Der Umgang mit den einzelnen Komponenten erfolgte auf Eis.

3.9 Zellbiologische Methoden

3.9.1 Kultivierung von Zelllinien

Hinsichtlich der Transfektionen wurden Huh7-, HeLa-, Vero-, PS- und HEK 293-Zellen verwendet. Die Kultivierung der adhärennten Zelllinien erfolgte in Zellkulturflaschen unterschiedlicher Größe. Für das Passagieren der Zellen wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen 2x mit PBS gewaschen und anschließend mit einem geeigneten Volumen Trypsinlösung überschichtet, welche sofort wieder von den Zellen entfernt wurde. Nach einer Inkubationszeit von ca. 5 min bei 37°C in einem begasten Feuchtbrutschrank wurden die Zellen im entsprechenden Medium aufgenommen und in geeigneter Verdünnung in die Zellkulturflasche überführt, wo sie bei 37°C im begasten Feuchtbrutschrank bis zur weiteren Anwendung inkubiert wurden.

Tabelle 3-3: Zelllinien mit entsprechendem Medium und Zusätzen

Zelllinie	Medium	Supplement
PS	DMEM	5 % FKS; 1 % Penicillin/Streptomycin
HEK 293	DMEM	5 % FKS; 1 % Penicillin/Streptomycin
HeLa	DMEM	10 % FKS; 1 % Penicillin/Streptomycin
Huh7	DMEM	10 % FKS; 1 % Penicillin/Streptomycin; 1% Natriumpyruvat; 1 % Essentielle Aminosäuren
Vero	DMEM	10 % FKS; 1 % Penicillin/Streptomycin

3.9.2 Zellzählung

Zum Zeitpunkt der Transfektion sollten die Zellen zu 70 - 80 % konfluent gewachsen sein. Um dies zu gewährleisten wurden die Zellen am Tag vor der Transfektion in einer geeigneten Verdünnung in Kulturmedium ausgesät. Die Zellzahlbestimmung erfolgte durch die Auszählung in der Neubauer-Zählkammer. Von den in 10 ml Kulturmedium resuspendierten Zellen wurden 10 µl in 190 µl Trypanblaulösung aufgenommen, gemischt und auf der Zählkammer unter ein Deckglas pipettiert. Trypanblau ist ein großer anionischer Farbstoff aus der Gruppe der Azofarbstoffe, welcher für Vitalfärbungen verwendet werden kann. Farbstoffe haben die Eigenschaft membranundurchlässig zu sein, sodass lebende Zellen farblos erscheinen während tote Zellen, aufgrund des Eindringens des Farbstoffes, blau angefärbt

sind. Es wurden in der Neubauer-Kammer acht Großquadrate ausgezählt, die durchschnittliche Zellzahl ermittelt und schließlich der Quotient mit dem Verdünnungsfaktor und dem Kammerfaktor 10^4 multipliziert. Das Produkt entspricht der Zellmenge pro ml Zellsuspension.

$$\text{Zellen/ml} = \text{Anzahl der Zellen} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

3.9.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Für das Einfrieren von Zellen einer 175 cm^2 konfluent bewachsenen Zellkulturflasche, wurden diese nach in einem Gemisch aus 7 ml Medium, 2 ml FKS und 1 ml DMSO resuspendiert und in 10 Kryoröhrchen aliquotiert. Einer einstündigen Lagerung bei 4°C folgte das Einfrieren bei -80°C für 2 d und schließlich die Aufbewahrung der Zellen in flüssigem Stickstoff.

Für das Auftauen der Zellen wurde ein Kryoröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff in einen $\sim 37^\circ\text{C}$ warmen Wasserbehälter überführt. Die in diesem Schutzgefäß aufgetauten Zellen wurden anschließend in ein Zellkulturgefäß pipettiert und mit frischem, vorgewärmten, Medium aufgefüllt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte wie beschrieben s.o.

3.9.4 Transfektion eukaryotischer Zellen

Die Transfektion von eukaryotischen Zellen wurde mit dem kationischen nicht-liposomalen Lipid Effectene™ durchgeführt (s. Tab.:3-1). Die Zellen sollten dafür am Tag der Transfektion zu 70 - 80 % konfluent in geeigneten Lochplatten gewachsen sein. Die Menge der einzusetzenden Transfektionskomponenten wurde entsprechend der Größe der verwendeten Kulturschalen bestimmt. Das Prinzip der Transfektion mit Effectene beruht auf der Ausbildung von Mizellen, welche die zu transfizierende DNA nach Endozytose in die Wirtszellen entlassen. Zunächst wird zu jedem Ansatz ein speziell DNA-kondensierender Enhancer gegeben. Dieses positiv geladene Reagenz interagiert mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäuren. Nach 5 min Inkubationszeit wird das Effectene Reagenz den Reaktionsansätzen zugeführt, gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei umhüllt das kationische nicht-liposomale Reagenz die kondensierte DNA. Nach Zugabe des geeigneten Wachstumsmediums zum Transfektionsansatz und zu den Zellen,

werden die Transfektionsansätze tröpfchenweise auf die Zellen gegeben. Die Inkubation der Zellen mit dem DNA-Lipid-Komplex erfolgte über Nacht bei 37°C im begasten Brutschrank (5 % CO₂).

Tabelle 3-4: Transfektionsschemata

Kulturschale	Zellzahl	DNA μg	Enhancer μl	EC-Puffer Endvolumen μl	Effectene μl	Medium Komplex μl	Medium Zellen μl
24 Loch-Platte	2,0 - 8,0 x 10 ⁴	0,2	1,6	60	5	350	350
6 Loch-Platte	0,9 - 4,0 x 10 ⁵	0,4	3,2	100	10	600	800

3.9.5 Präparation der Lysate

Nach der Transfektion (s. 3.9.4) folgte eine Inkubation für 48h bei 37°C im Brutschrank unter CO₂-Begasung, welche nur durch einen Mediumwechsel nach 24h unterbrochen wurde. Zur Vorbereitung der Lyse wurden die Zellen 2x mit kaltem PBS gewaschen und anschließend mit 100 μl Lysispuffer (incl. 0,5 mM DTT) versetzt. Es folgte eine Inkubation für 30 min bei -70°C, wonach die Zellen vollständig in vorgekühlte Eppendorfgefäße überführt, 2 min bei 13000 UpM und 4°C zentrifugiert und die Überstände sofort im Luminometer vermessen wurden.

3.9.6 Isolierung von DNA aus Zellkultur

Die Isolierung der DNA aus Zellen erfolgte unter Verwendung des DNeasy Tissue Kit von Qiagen. Die in PBS gewaschenen Zellen wurden in einem Volumen von 200 μl mit 20 μl Proteinase K versetzt und gevortext. Es folgte die Lyse der Zellen durch Mischen mit 200 μl Lysispuffer AL und Inkubation für 10 min bei 56°C. Das Lysat wurde mit 200 μl Ethanol (100 %) versetzt und auf eine Silikamembran überführt. Einem Zentrifugationsschritt bei 8000 rpm für 1 min folgten zwei Waschschrte mit jeweils 500 μl Waschpuffer AW1 und AW2. Die nachfolgende Elution der DNA erfolgte mit 100 μl Tris-haltigem Puffer AE.

3.9.7 Gesamt-RNA Isolierung aus eukaryotischen Zellen

Die Präparation von RNA aus Zellen wurde unter Verwendung des RNeasy Mini Kit von Qiagen durchgeführt. Die in Kulturschalen angewachsenen Zellen wurden nach dem Ablösen mit Trypsinlösung zwei Mal mit PBS gewaschen, abzentrifugiert und anschließend mit dem Mercaptoethanolhaltigen Lysispuffer RLT versetzt. Das Lysat wurde auf eine QIAshredder® Säule überführt und bei 13.000 rpm für 2 min zentrifugiert. Das gewonnene homogenisierte Lysat wurde mit 600 µl 70 %-Ethanol gemischt und auf eine RNeasy Mini Säule pipettiert. Zentrifugation und Waschen mit RW1 entfernte Proteine und chaotrope Salze. Um die ebenso an die Silikagelmembran gebundene DNA zu eliminieren, wurde DNase I in Puffer RDD gelöst auf die Säule gegeben und diese bei Raumtemperatur bis zu 45 min inkubiert. Im Anschluss folgten zwei weitere Schritte mit den Waschpuffern RW1 und RPE, bevor die RNA mit RNase freiem Wasser eluiert werden konnte. Die Messung der RNA fand am Spektrometer statt (s. 3.4.4.2). Die RNA-Proben wurden in einer 50fachen Verdünnung in ddH₂O gemessen.

3.9.8 Zellaufschluss für die Präparation von Proteinen

Die Expression der ORF1-Derivate als HA-Fusionsproteine erfolgte *in vivo* in eukaryotischen Zellen. Die Transfektion der Zellen wurde in 6-Loch Platten durchgeführt. Nach Inkubation der Zellen für 48h bei 37°C in einem mit CO₂ begasten Brutschrank wurden die Zellen ein Mal mit PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml vorgekühltem Lysispuffer überschichtet. Die Inkubation der Zellen erfolgte für 1 h schwenkend auf Eis. Das Lysat wurde in ein vorgekühltes Eppendorfgefäß überführt, gevortext und zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein weiteres vorgekühltes Gefäß überführt und konnte anschließend bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C aufbewahrt werden.

3.10 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz ermöglicht es, Proteine in Geweben und Zellen mit Hilfe von spezifischen Antikörpern zu visualisieren und somit die Lokalisation der Proteine innerhalb von Zellen oder Geweben nachzuweisen. Dabei unterscheidet man die direkte von der indirekten Immunfluoreszenz. In der direkten Immunfluoreszenz wird unter geeigneten Bedingungen ein Fluorochrom-konjugierter Antikörper direkt auf das Probenmaterial gebracht, während bei der indirekten Detektion auf einen Primärantikörper ein fluorochromgekoppelter Sekundärantikörper folgt. Der Nachweis beruht auf der Affinität des Antikörpers zu einem bestimmten Epitop. In der vorliegenden Arbeit wurden der direkte und der indirekte Immunfluoreszenztest gekoppelt durchgeführt.

3.10.1 Der indirekte Immunfluoreszenztest

Der Immunfluoreszenztest wurde in 24-Loch Platten durchgeführt, wobei in jede Vertiefung vor der Aussaat der Zellen sterile Deckgläser eingelegt wurden. Nach Transfektion (s. 3.6.1.2) und Inkubation im begasten CO₂-Brutschrank bei 37°C für 48h wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und anschließend mit 4 % Formaldehydlösung für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach der Fixierung erfolgte ein dreimaliges Waschen mit PBS. Die anschließende Permeabilisierung mit 0,1 % TritonX-100 in PBS erfolgte für 10 min bei Raumtemperatur. Durch zweifaches Waschen mit PBS wurde die Permeabilisierungslösung entfernt, woraufhin die Zellen für 1 h bei Raumtemperatur geblockt werden konnten (PBS, 0,1 % Tween, 1 % BSA). Nach Entfernung des Blockpuffers wurden jeweils 100 µl des Primärantikörpers in Blockpuffer zu den Zellen gegeben und für 1 h bei Raumtemperatur schwenkend inkubiert. Es folgten drei Waschschrte mit Waschpuffer (PBS, 0,05 % Tween), bevor 100 µl des Sekundärentikörpers in Blockpuffer zu den Zellen gegeben und für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur schwenkend inkubiert wurde. Nach Entfernung nichtgebundenen Sekundärantikörpers durch dreifaches Waschen wurde im Falle von Mehrfachmarkierungen ein weiterer Primärantikörper in Blockpuffer, sowie der Sekundärantikörper wie oben beschrieben verwendet. Anschließende Waschschrte schlossen die Antikörpermarkierung ab, so dass die Deckgläschen mittels Mowiol (8 µl) auf Objektträger eingebettet werden konnten. Um eine bessere Fixierung der Deckgläschen auf dem Objektträger zu erhalten,

wurden die Objektträger ca. 16 h horizontal im Kühlschrank gelagert. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe der konfokalen Laserscanmikroskopie analysiert (s. 3.11.1).

3.11 Mikroskopie

3.11.1 Konfokale Laserscanmikroskopie

Der Nachweis von viralen Proteinen in den transfizierten Zellen erfolgte mittels der Konfokalen Laserscanmikroskopie (konfokale LSM). Im LSM ist es möglich, virale Proteine zu detektieren und zu lokalisieren. Während in der konventionellen Lichtmikroskopie die Transformation Objekt-zu-Bild für alle Objektpunkte gleichzeitig, d.h. parallel erfolgt, wird in der konfokalen LSM die Probe punktweise (d.h. seriell) bestrahlt und die physikalischen Wechselwirkung, die das Laserlicht in der gerade bestrahlten Objektstelle hervorruft (z.B. die Fluoreszenz) ebenso punktweise gemessen. Damit entstehen die Bilder mit mikroskopischer Auflösung in einem konfokalen LSM ausschließlich arithmetisch. Ein wesentlicher Vorteil der konfokalen LSM ist, dass von einer Probe emittierte Licht in einzelnen Ebenen zu sammeln. Eine Lochblende, die zur Fokusebene konjugiert (konfokal) angeordnet ist, sorgt dafür, dass das Licht, das nicht aus dieser Ebene stammt, auch nicht vom Detektor erfasst werden kann. Der so erzeugte optische Schnitt ist ein kontrastreiches, hochaufgelöstes Abbild der Probe.

Für die Detektion der zu untersuchenden Proteine wurden diese entweder an die Fluorochrome EGFP und Far-Red kloniert exprimiert oder unter Verwendung der direkten und indirekten Immunfluoreszenz (s. 3.10.1) mit Antikörpern, welche mit den Fluorochromen FITC, Rhodamin oder Cy5 konjugiert waren, nachgewiesen. Durch die Bestrahlung der Fluorochrome mit Licht einer definierten Wellenlänge werden Elektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben. Hier verweilen sie sehr kurz, verlieren dabei ein wenig Energie und fallen dann unter Aussendung von längerwelligem Emissionslicht auf das ursprüngliche Energieniveau zurück. Die Emission kann nachgewiesen und analysiert werden.