

3 METHODEN

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Stammhaltung von Bakterien

Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden die verwendeten *Escherichia coli* (*E.coli*)-Stämme (Tab. 2.1) als Glycerinkulturen (1:2) bei -20°C gelagert. Häufiger benötigte Bakterienstämme, konnten auf LB-Vollmediumplatten (1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl, 1,5% (w/v) Agar Agar, ggf. Ampicillin 100 µg/ml Endkonzentration), umwickelt mit PARAFILM (American National Can), mehrere Wochen bei 4°C gelagert werden.

3.1.2 Kultivierung von Bakterien

Die *E.coli*-Kulturen wurden unter ausreichender Belüftung bei 37°C in LB-Vollmedium (1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl) angezogen. Bestand eine Plasmid-vermittelte Ampizillinresistenz, so wurden die Medien mit Ampizillin (Serva) in einer Endkonzentration von 100 µg/µl supplimentiert. Die Inkubation erfolgte jeweils unter Schütteln bei 220 rpm (INNOVA 4330, New Brunswick Scientific). Beimpft wurden die Medien durch Übertragung von Einzelkolonien von Nährbodenplatten oder von Aliquots entsprechender Vorkulturen. Für eine Vorkultur wurden 5 ml LB-Ampizillin-Medium mit einer Bakterienkolonie oder 4 µl einer Glycerindauerkultur angeimpft und bei 37°C über Nacht schüttelnd inkubiert.

3.1.3 Bestimmung der Zelldichte von Bakterienkulturen

Die Zelldichte der Bakterienkulturen wurde durch Messen der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm im Photometer (BIOPHOTOMETER, Eppendorf) bestimmt. Zuvor wurden die Kulturen bis zu einer maximalen Zelldichte entsprechend einer von OD₆₀₀ von 1 mit Flüssigmedium verdünnt.

3.1.4 Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation durch Hitzeschock

Die Transformation von Plasmid-DNA sowie ligierter Plasmid-DNA nach Klonierungen wurde nach der Hitzeschock-Methode durchgeführt (HANAHAN, 1983). Hierfür mussten die *E.coli*-Stämme Top10 F' (Stratagene) und BL21 CodonPlus(DE3)-RP (Stratagene) durch eine spezielle Behandlung in einen kompetenten Zustand versetzt werden, der ihnen die effektive Aufnahme von DNA ermöglichte. Dazu wurde nach einem Protokoll zur Herstellung chemisch kompetenter Bakterien von Qiagen verfahren (QIAexpressionist, 5. Auflage, 2003, S.39).

Als Transformation wird das Einbringen von Plasmid-DNA in elektro- oder chemokompetente Bakterien und Hefen bezeichnet (COHEN et al., 1972). Für eine Transformation der *E.coli*-Stämme Top10 F' und BL21 CodonPlus(DE3)-RP wurde pro Ansatz ein 100 µl Aliquot chemisch kompetenter Bakterien langsam auf Eis aufgetaut. Die Menge der zu transformierenden DNA variierte bei Plasmid-DNA zwischen 10 pg und 1 ng

und bei Ligationen zwischen 5 µl und 20 µl des entsprechenden Ligationsansatzes. Die Zellen wurden mit der zu transformierenden DNA versetzt und anschließend für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dem nachfolgenden Hitzeschock von 90 Sekunden bei 42°C folgte eine zweiminütige Inkubation der Zellen auf Eis. Im Anschluss wurden die Zellen mit 500 µl LB-Medium ohne Antibiotikum versetzt und 45 bis 60 Minuten bei 37°C geschüttelt, so dass die über das eingebrachte Plasmid vermittelte Resistenz ausgebildet werden konnte. Anschließend wurden die Bakterien bei 2000 x g für 2 Minuten pelletiert (CENTRIFUGE 5415D, Eppendorf), in 100 µl Medium resuspendiert, auf LB-Nährboden-Platten mit Selektionsantibiotikum ausplattiert und etwa 16 Stunden bei 37°C inkubiert.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe der kommerziellen Kits QIAPREP SPIN MINIPREP KIT (Qiagen) und INVISORB PLASMID MAXI KIT (Invitex) nach Angaben des Herstellers. Diese Aufreinigungen basieren auf dem Prinzip der alkalischen Lyse und der Bindung der Plasmid-DNA an eine Silica-Matrix, so isolierte DNA weist eine sehr hohe Reinheit auf.

Für Anwendungen, wie die Transfektion eukaryontischer Zellen wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe des ENDOFREE PLASMID MAXI KIT (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert, um eine reine und nahezu Endotoxin-freie DNA zu erhalten und somit höhere Transfektionseffizienzen zu erzielen. Die DNA wurde jeweils mit Wasser eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.2 Isolierung genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen und Gewebe

Zur Isolierung genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen wurde das DNEASY BLOOD & TISSUE KIT (Qiagen) verwendet. Ca. 1×10^6 Zellen wurden bei 1000 x g für 10 Minuten pelletiert (CENTRIFUGE 5415D, Eppendorf) und in 200 µl PBS-Puffer (140 mM NaCl, 10 mM KCl, 6,4 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 2 mM KH_2PO_4) resuspendiert. Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten nach Angaben des Herstellers.

Sollten aus einer Probe sowohl RNA, DNA und Protein isoliert werden, erfolgte die Aufreinigung mittels TRI REAGENT (Sigma-Aldrich). Zur Aufreinigung von DNA wurde der aus der RNA-Aufreinigung verbleibende Rest TRI REAGENT (3.2.7) verwendet. Die DNA wurde nach den Angaben des Herstellers mittels Ethanol (Roth) gefällt und aufgereinigt. Im Anschluss wurde die DNA-Menge über die Messung der optischen Dichte quantifiziert (3.2.9) und die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Diese Methode wurde auch zur Isolierung von DNA aus Gewebeproben verwendet.

3.2.3 Isolierung genomischer DNA aus Ohrbiopsien

Ohrbiopsien stellen eine Möglichkeit dar, einem Schwein schnell und ohne größeren operativen Eingriff Gewebe zur DNA-Isolierung zu entnehmen. Da diese Ohrbiopsien zu einem großen Teil aus Knorpel bestehen, eignet sich die unter 3.2.2 beschriebene DNA-Isolierungsmethode nicht.

Dementsprechend wurde auf eine Salz-Chloroform-Extraktion (modifiziert nach MÜLLENBACH et al., 1989) zurückgegriffen: ca. 60 mg Gewebe wurden mit 500 µl HOM-Puffer (160 mM Saccharose, 80 mM, EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8,0), (Roth) und 20 µl einer Proteinase K-Lösung (20 mg/ml, Invitrogen) versetzt und für 12 bis 18 Stunden bei 60°C inkubiert. Es folgte die Zugabe von 200 µl einer 4,5 M Natriumchloridlösung und 700 µl Chloroform/Isoamylalkohol. Nach kräftiger Durchmischung wurde die Lösung zur Phasentrennung für 10 Minuten bei 10000 x g und 4°C zentrifugiert (CENTRIFUGE 5804R, Eppendorf). Es entstanden vier Phasen: die oberste wässrige Phase, welche die DNA enthielt, gefolgt von einer NaCl-, einer Gewebe- und einer Chloroformphase. Die wässrige DNA-haltige Phase wurde vorsichtig abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zum Ausfällen der DNA mit 700 µl Isopropanol (Roth) versetzt. Nach einer Zentrifugation (10000 x g, 10 min, 4°C) wurde der Überstand entfernt und das DNA-Pellet durch die Zugabe von 200 µl 70% (v/v) Ethanol (Roth) und einer weiteren Zentrifugation (s.o.) gewaschen. Dieser Vorgang wurde nochmals wiederholt, die DNA anschließend getrocknet und in 70 µl H₂O resuspendiert.

3.2.4 Phenol/Chloroform-Extraktion

Die Phenol/Chloroform-Extraktion stellt eine einfache Methode zur DNA-Aufreinigung dar, bei der hauptsächlich zelluläre Proteine und Protein-komplexierte genomische DNA von Plasmid-DNA abgetrennt werden.

Die DNA-haltige Lösung wurde mit gleichem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1, Sigma-Aldrich) versetzt, wobei kleine Volumina zunächst auf mindestens 100 µl mit Wasser aufgefüllt wurden. Nach intensivem Mischen wurde durch Zentrifugation (16000 x g, 2 min, RT, CENTRIFUGE 5415D, Eppendorf) wieder eine Phasentrennung erreicht. Die obere DNA-haltige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und einer Ethanol-fällung (3.2.5) unterzogen.

3.2.5 Ethanol-fällung von DNA-Lösungen

DNA-haltige Lösungen wurden zur Einkonzentrierung der DNA sowie zum Wechsel von Inkubationspuffern mit Ethanol gefällt. Hierfür wurde die DNA-haltige Lösung mit 0,1 Volumen 3 M Na-Acetat (pH 5,2; Roth) und 2,5 Volumen absolutem Ethanol (Roth) versetzt. Nach einer Inkubation für 20 Minuten bei -20°C wurde die DNA 20 Minuten bei 16000 x g und 4°C pelletiert (CENTRIFUGE 5415D, Eppendorf). Zum Entfernen des Na-Acetats wurde das DNA-Pellet anschließend mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und bei RT getrocknet. Die Resuspendierung des Pellets erfolgte je nach DNA-Menge in 20 bis 200µl Wasser oder TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA pH 8,0).

3.2.6 Isopropanol-fällung von DNA-Lösungen

DNA kann auch mit Isopropanol aus wässrigen Lösungen gefällt werden. Bei dieser Methode werden vergleichsweise weniger Salze präzipitiert als bei der Ethanol-fällung. Durch die Zugabe des 0,7-fachen Volumens Isopropanol (Roth) und des 0,1-fachen Volumens 3 M Na-Acetat (pH 5,2) wurde die Plasmid-DNA für 10 Minuten bei Raumtemperatur gefällt. Die Pelletierung erfolgte durch zehninminütige Zentrifugation (16000 x g, 4°C, CENTRIFUGE 5415D, Eppendorf). Anschließend wurde das Präzipitat mit

70 % (v/v) Ethanol gewaschen und für 5 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wurde nach dem Trocknen in Wasser oder TE-Puffer (siehe 3.2.5) aufgenommen.

3.2.7 Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen und Gewebe

Die RNA-Isolierung erfolgte anhand einer kombinierten Methode mit Hilfe von TRI REAGENT (Sigma-Aldrich) und des RNEASY MINI KITS (Qiagen). Für den Zellaufschluss wurden $1,5 \times 10^6$ Zellen mit eiskaltem 1x PBS-Puffer gewaschen, sedimentiert (1000 x g, 10 min, 4°C, Centrifuge 5415D, Eppendorf) und in 1 ml TRI REAGENT resuspendiert. Nach fünfzehnminütiger Inkubation bei RT wurden 200 µl Chloroform (Merck) hinzugegeben und mindestens 15 Sekunden gemischt. Nach erneuter Inkubation (15 min, RT) wurde das Zelllysate zur Phasentrennung zentrifugiert (12000 x g, 15 min, 4°C), die obere RNA-haltige Phase vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Ein entsprechendes Volumen 70%-igen Ethanol (v/v in DEPC-Wasser) wurde hinzugegeben, vermischt und auf eine Säule des RNEASY MINI KITS geladen. Die Aufreinigung mit Hilfe dieses Kits basiert auf einer Silica-Gelmembran-Reinigung. Durch Zentrifugation (10000 x g, 1 min) konnte die RNA an die Matrix binden und wurde anschließend durch Zugabe des Puffer RW1 (Qiagen) gewaschen. Um eine eventuelle Kontamination der RNA mit DNA zu vermeiden, wurde diese durch direkte Zugabe von 30 Einheiten DNase (gelöst in 80 µl RDD-Puffer, Qiagen) auf die Säulenmembran für 15 Minuten bei RT verdaut. Es folgten Waschrritte nach Angaben des Herstellers. Die isolierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Die Verwendung von TRI REAGENT ermöglicht die Isolierung von RNA, DNA und Protein aus einer Probe. Die Interphase und die untere organische Phase enthalten DNA bzw. Protein. (Aufreinigung siehe 3.2.2, 3.3.1).

Des Weiteren ist mit Hilfe von TRI REAGENT auch die Isolierung von RNA, DNA und Protein aus Gewebeproben möglich. Die Gewebeproben wurden zunächst in flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistill (Roth) zerkleinert und anschließend im Homogenisatorgefäß mit passendem Kolben (Wheaton) in TRI REAGENT homogenisiert. Die Proben können in TRI Reagent bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden. Die weitere Aufreinigung erfolgte auch bei Gewebeproben wie bereits beschrieben mit Hilfe des RNEASY MINI KITS (Qiagen).

3.2.8 Isolierung von miRNAs (microRNA) aus eukaryontischen Zellen

Die Isolierung von miRNAs (kleiner als 200 Nukleotide) und siRNAs (15 bis 30 Nukleotide) aus eukaryontischen Zellen und Gewebeproben erfolgte mit Hilfe des MIRVANA™ miRNA ISOLATION KITS (Ambion). Diese Methode kombiniert die organische Extraktion mit einer Festphasen-Extraktion. Nach der Zugabe von Ethanol können in Abhängigkeit des Ethanolgehaltes Gesamt-RNA bzw. miRNAs an Glasfaserfiltern immobilisiert und anschließend eluiert werden. Die Aufreinigungen erfolgten entsprechend den Angaben des Herstellers.

3.2.9 Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA-Lösungen

Die Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA-Lösungen erfolgte mit Hilfe der UV-Spektrophotometrie mit dem BIOPHOTOMETER (Eppendorf) oder dem NANO DROP SPECTROPHOTOMETER (Peqlab). Im Falle der NanoDrop-Messung wurde 1 µl der zu

messenden Proben direkt gemessen. Für die Messung im BIOPHOTOMETER wurden meist fünfundzwanzigfache Verdünnungen in einem Endvolumen von 50 bis 100 µl hergestellt und diese photometrisch in einer Eppendorf UVETTE (Eppendorf) gegen Wasser gemessen.

3.2.10 cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase

Mit Hilfe des retroviralen Enzyms Reverse Transkriptase kann aus RNA die komplementäre cDNA hergestellt werden. Diese spezifische, RNA-abhängige DNA-Polymerase benötigt zur Synthese wie andere Polymerasen auch ein Oligonukleotid, welches an die RNA bindet und den Ort der beginnenden Reaktion kennzeichnet. Für eine unspezifische Synthese der gesamten cDNA empfiehlt sich die Verwendung von oligo-dT oder *random hexamer* Primern. Oligo-dT *primer* bestehen aus 10 bis 15 Thyminbasen, welche komplementär zum Poly-A-Schwanz der eukaryontischen mRNA sind. *Random hexamer primer* bestehen aus sechs zufällig zusammengesetzten Basen, die an zufälligen Positionen der zellulären RNA binden. Es können aber auch Gen-spezifische *primer* eingesetzt werden. Die cDNA-Synthese aus zellulärer Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe des REVERTAID™ H MINUS FIRST STRAND CDNA SYNTHESIS KIT (Fermentas) unter Verwendung von *random hexamer* Primern nach Angaben des Herstellers.

3.2.11 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR (SAIKI et al., 1985) ermöglicht *in vitro* eine exponentielle Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente mit Hilfe zweier flankierender hybridisierender Oligonukleotide und einer thermostabilen DNA-Polymerase (Taq-Polymerase, CHIEN et al., 1976).

Mit Hilfe der PCR ist es möglich, genomische DNA hinsichtlich einer Provirusintegration (z.B. des porzinen endogenen Retrovirus) zu untersuchen. Um eine Klonierung spezifischer DNA-Sequenzen in Expressionsvektoren zu erleichtern kann die PCR auch dazu verwendet werden, lineare DNA-Fragmente mit Restriktionsschnittstellen zu versehen. In diesem Fall wurde für die Amplifikation die PFU-POLYMERASE (Fermentas) verwendet, die sich aufgrund ihrer 3'-5'-Exonukleaseaktivität durch eine geringe Mutationsrate auszeichnet.

Die PCR erfolgte mit Hilfe des MASTERCYCLER EP GRADIENT S (Eppendorf) in PCR-Reaktionsgefäßen (PCR Soft Strips, Biozym) mit einem Reaktionsvolumen von 20 bis 25 µl. Die Reaktionsbedingungen (modifiziert nach SAIKI et al., 1985) wurden wie folgt gewählt (Tab. 3.1):

Tabelle 3.1: Komponenten eines Standard-PCR-Ansatzes

Komponente	Volumen [µl]
<i>template</i> DNA (100 ng/µl)	1,0
10x PCR-Puffer (inkl. 15 mM MgCl ₂ , Applied Biosystems)	2,0
dNTPs (10 mM each, Fermentas)	0,5
<i>sense primer</i> (10 pmol/µl)	0,5
<i>antisense primer</i> (10 pmol/µl)	0,5
AMPLITAQ GOLD (5 U/µl, Applied Biosystems)	0,2
H ₂ O, Nuklease-frei	15,3
	20,0

Die verwendeten Temperatur-Programme variierten entsprechend der Primerkombination. Die *annealing* Temperatur (T_M) ist von der Länge und dem prozentualen GC-Gehalt der Primer abhängig und wurde 3°C unter dem errechneten Wert gewählt. Wiesen die Primer unterschiedliche T_M -Werte auf, wurde vom niedrigeren ausgegangen. Berechnet wurde der T_M -Wert wie folgt, wobei n die Länge des Primers darstellt (CHESTER AND MARSHAK, 1993):

$$T_M [^\circ\text{C}] = 69,3 + 0,41 \cdot (\% \text{ G/C}) - \frac{650}{n}$$

Aus den Schmelztemperaturen beider Primer wurde die *annealing* Temperatur wie folgt berechnet:

$$T_A [^\circ\text{C}] = \frac{(T_{M1} + T_{M2})}{2} - 3^\circ\text{C}$$

wobei T_{M1} und T_{M2} die Schmelztemperaturen der zwei eingesetzten Primer darstellen. Die typischen Temperaturbedingungen sind im Folgenden aufgeführt:

95°C	15 min	}	1 Zyklus
95°C	30 sec		}
x°C	30 sec		
72°C	1 min		
72°C	5 min		1 Zyklus
4°	∞		

3.2.12 *one-step* Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)

Die *one-step* RT PCR kombiniert die Umschreibung von RNA zu cDNA und eine anschließende PCR mit Hilfe Gen-spezifischer Primer in einem Schritt. Das Umschreiben der eingesetzten RNA in cDNA erfolgte bei 50°C für 30 Minuten. Dem folgte die Inaktivierung der Reversen Transkriptase und gleichzeitige Aktivierung der Taq DNA Polymerase bei 95°C für 5 Minuten. Im Anschluss wurde eine konventionelle PCR (siehe 3.2.11) durchgeführt. Für die *one-step* RT-PCR wurde das SUPERSRIPT ONE-STEP RT-PCR SYSTEM MIT PLATINUM TAQ DNA POLYMERASE KIT (Invitrogen) verwendet. Ein typischer RT-PCR Ansatz und die Temperaturbedingungen sind in Tabelle 3.2 aufgeführt:

Tabelle 3.2: Komponenten eines *one-step* RT-PCR-Ansatzes

Komponente	Volumen [μl]
Gesamt-RNA (20 ng/ μl)	5,0
2x Reaktionspuffer (0,2mM je dNTP, 1,2mM MgSO ₄ , Invitrogen)	10,0
<i>sense primer</i> (10 pmol/ μl)	1,0
<i>antisense primer</i> (10 pmol/ μl)	1,0
SUPERSRIPT RT/PLATINUM® TAQ MIX (Invitrogen)	0,5
H ₂ O Nuklease-frei	2,5
	20,0

50°C	30 min	1 Zyklus
95°C	2 min	} 30 Zyklen
95°C	45 sec	
x°C	45 sec	
72°C	1 min	
72°C	7 min	1 Zyklus
4°C	∞	

3.2.13 *real-time* PCR

Die *real-time* PCR ist eine sensitive Technik zur Amplifikation und gleichzeitigen Quantifizierung einer spezifischen DNA-Sequenz, basierend auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR (HIGUCHI et al., 1992). Die Quantifizierung erfolgt durch Fluoreszenzmessungen während der PCR-Zyklen und unterscheidet sich somit von anderen quantitativen PCR-Methoden (qPCR), die erst nach Ablauf der PCR quantitativ ausgewertet werden. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Die PCR-Produkte können entweder durch Fluoreszenzfarbstoffe, die unspezifisch doppelsträngige DNA binden, oder durch Fluoreszenz-markierte Sequenz-spezifische Sonden detektiert werden. Letztere stellen z.B. die TaqMan-Sonden dar.

TaqMan-Sonden sind Sequenz-spezifische Oligonukleotid-Sonden, die ein Fluophor am 5'-Ende und einen *quencher*-Farbstoff am 3'-Ende tragen. Die unmittelbare Nähe des Fluophors zum *quencher*-Farbstoff (Förster-Radius) verhindert die Fluoreszenz. Während der kombinierten *Anlagerungs*- und *Elongations*phase der PCR wird die Sonde durch die Exonuklease-Aktivität der Taq-DNA-Polymerase gespalten, was zur räumlichen Trennung von Fluophor und *quencher*-Farbstoff führt. Dies resultiert in einer detektierbaren Fluoreszenz (LEE et al., 1993a), die proportional zur Menge des amplifizierten PCR-Produktes ist. Zur Durchführung der *real-time* PCR wurde der Cyclyer MX4000 (Stratagene) verwendet. Ein typischer Reaktionsansatz und die Temperaturbedingungen sind in Tabelle 3.3 aufgeführt:

Tabelle 3.3: Komponenten eines *real-time* PCR-Ansatzes

Komponente	Volumen [μ l]
template DNA (100 ng/ μ l)	1,0
10x PCR-Puffer (inkl. 15 mM MgCl ₂ , Applied Biosystems)	2,0
dNTPs (10 mM <i>each</i> , Fermentas)	0,5
<i>sense primer</i> (10 pmol/ μ l)	0,5
<i>antisense primer</i> (10 pmol/ μ l)	0,5
spezif. Sonde (10 pmol/ μ l)	0,5
AMPLITAQ GOLD (5 U/ μ l, Applied Biosystems)	0,2
H ₂ O	14,8
	20,0

95°C	10 min	1 Zyklus
95°C	30 sec	} 45 Zyklen
x°C	1 min	
4°C	∞	

Aufgrund der geringen Größe des PERV-*gag*-Amplifikats (ca. 100 bp) konnte auf den Elongationsschritt verzichtet werden.

3.2.14 SYBR GREEN *real-time* PCR

Im Gegensatz zur TaqMan-Sonden *real-time* PCR interkaliert der bei dieser DNA-Quantifizierungsmethode verwendete Fluoreszenzfarbstoff SYBR GREEN unspezifisch in doppelsträngige DNA-Moleküle. Da auch unspezifische PCR-Produkte sowie Primer-Dimere zum Fluoreszenzsignal beitragen, ist es erforderlich, dass nur spezifische PCR-Produkte entstehen. Die Interkalierung des Farbstoffes führt zu einer starken Erhöhung der Fluoreszenz, wohingegen freies SYBR green nur sehr schwach fluoresziert. Die Signalstärke nimmt aufgrund der Amplifikation des PCR-Produktes mit zunehmender Zyklenzahl zu. Zur Durchführung der SYBR GREEN *real-time* PCR wurde der BRILLIANT SYBR GREEN QPCR MASTERMIX (Stratagene) mit ROX als Referenzfluorophor und der MX-4000-Cycler (Stratagene) verwendet. Am Ende der PCR schloss sich ein zusätzliches Temperaturprogramm zur Ermittlung der Dissoziationskurven an. Ein typischer Reaktionsansatz und die Temperaturbedingungen sind in Tabelle 3.4 aufgeführt:

Tabelle 3.4: Komponenten eines SYBR GREEN *real-time* PCR-Ansatzes

Komponente	Volumen [μ l]
cDNA	4,0
BRILLIANT SYBR GREEN QPCR MASTERMIX (2 x), (Stratagene)	6,0
<i>sense primer</i> (10 pmol/ μ l)	0,5
<i>antisense primer</i> (10 pmol/ μ l)	0,5
ROX-Lösung (100 μ M)	0,25
H ₂ O, Nuklease-frei	0,75
	12,0
95°C 10 min	} 1 Zyklus
95°C 30 sec	
x°C 1 min	} 40 Zyklen
72°C 40 sec	
95°C 1 min	1 Zyklus
55°C \uparrow 30 sec	41 Zyklen (Temperaturgradient für die Dissoziationskurve)
4°C ∞	

3.2.15 *one-step* RT (Reverse Transkriptase) *real-time* PCR

Die *one-step* RT *real-time* PCR kombiniert die Umschreibung von RNA zu cDNA und eine anschließende *real-time* PCR mit Hilfe Gen-spezifischer Primer in einem Schritt (siehe 3.2.12). Für diese PCR wurde das SUPERSRIPT ONE-STEP RT-QPCR SYSTEM MIT PLATINUM TAQ DNA POLYMERASE (Invitrogen) verwendet.

Tabelle 3.5: Komponenten eines *one-step* RT *real-time* PCR-Ansatzes

Komponente	Volumen [μ l]
Gesamt-RNA (20 ng/ μ l)	5,0
2x Reaktionspuffer (0,2mM je dNTP, 1,2mM MgSO ₄ , Invitrogen)	10,0
<i>sense primer</i> (10 pmol/ μ l)	1,0
<i>antisense primer</i> (V10 pmol/ μ l)	1,0
SUPERSRIPT RT/PLATINUM® TAQ MIX (Invitrogen)	0,5
Sonde (10 pmol/ μ l)	0,5
H ₂ O Nuklease-frei	2,5
	20,0

50°C	10 min	1 Zyklus
95°C	2 min	1 Zyklus
95°C	15 sec	} 45Zyklen
54°C	30 sec	
4°C	∞	

Ein typischer RT-PCR Ansatz und die Temperaturbedingungen ist in Tabelle 3.5 aufgeführt. Die Analyse der *real-time* RT-PCR erfolgte digital über die während des Laufes aufgenommenen Daten. Die Auswertung erfolgte über den sog. *threshold cycle* (C_T). Dieser Wert gibt den Zyklus der PCR an, in dem die Fluoreszenz einer Probe das erste Mal deutlich die Hintergrundfluoreszenz (Schwellenwert) übersteigt. Hierbei gilt, je mehr Ziel-RNA in der Probe vorhanden ist, desto kleiner ist der C_T -Wert.

Die Effizienz der Reaktion bei optimalen Bedingungen kann über die Steigung der Geraden der C_T -Werte bei definierten Verdünnungen bestimmt werden (Stratagene Application Note #10). Für akkurate und reproduzierbare Daten sollte die Effizienz nahe bei 100% liegen, d.h., die *template* DNA wird mit jedem Zyklus verdoppelt. Für die Bestimmung der Effizienz wurde die entsprechende RNA seriell zwischen 50 ng und 0 ng verdünnt und die Effizienz der einzelnen Primer bestimmt. Für die Berechnung der Effizienz gilt:

$$\text{Exponentielle Amplifikation} = 10^{(-1/\text{Steigung})}$$

und

$$\text{Effizienz } E = [10^{(-1/\text{Steigung})}] - 1$$

Die weitere Auswertung erfolgte nach Modifikation der von K. Livak beschriebenen $\Delta\Delta C_T$ -Methode (LIVAK AND SCHMITTGEN, 2001). Zusätzlich zur beschriebenen Abgleichung der Proben auf ein Haushaltsgen wurden für jeden Ansatz 50 ng Gesamt-RNA verwendet. Für die einzelnen Proben kann dann die Expression relativ zu einem Kalibrator bestimmt werden. Als Kalibrator wurde RNA von z.B. untransduzierten oder untransfizierten Zellen verwendet. Mittelwerte und Standardabweichungen der Replikate sowie die Bestimmung der relativen PERV-Expression wurden mit dem Tabellenkalkulations-Programm Microsoft Excel durchgeführt.

Es gilt:

$$\text{relative Expression} = (1+E)^{-\Delta CT}$$

und

$$\Delta CT = CT \text{ Probe} - CT \text{ Kalibrator}$$

3.2.16 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen diente sowohl als präparatives Hilfsmittel für Klonierungszwecke aber auch analytischen Zwecken zur Überprüfung von Plasmiden nach Klonierungen. Jedes Restriktionsenzym hat eine spezifische Erkennungssequenz, die unter optimalen Pufferbedingungen und Inkubationstemperatur geschnitten wird. Die Dauer der Inkubation richtet sich nach der Temperatur und den eingesetzten Mengen an DNA und Enzym. Bei optimalen Bedingungen spaltet eine Einheit [1 U] Restriktionsenzym 1 μ g DNA in einer Stunde.

Analytische Spaltungen konnten durch die verschiedenen Puffersysteme zeitsparend mit zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen in einem Reaktionsansatz durchgeführt

werden, sofern beide Enzyme ausreichende Kompatibilität für einen Puffer zeigten. Für präparative Zwecke wurde jedoch einzeln und nacheinander gespalten, um so eine nahezu vollständige Spaltung zu erreichen und den Erfolg jeder einzelnen Spaltung verifizieren zu können. Für analytische Spaltungen wurden ca. 500 ng DNA mit 2 µl 10x Puffer und ca. 0,5 Einheiten Enzym (New England Biolabs) gemischt und mit Wasser zu einem Endvolumen von 20 µl aufgefüllt. Bei präparativen Spaltungen wurden 1 µg bis 10 µg DNA und pro Mikrogramm DNA 1 bis 1,5 Einheiten Enzym eingesetzt. Die optimale Aktivität einiger Enzyme erforderte den Zusatz von BSA. Das Ergebnis einer Spaltung konnte auf einem Agarosegel analysiert werden (3.2.18).

3.2.17 Ligation von DNA-Fragmenten mit der T4 DNA-Ligase

Die T4 DNA-Ligase katalysiert unter ATP-Verbrauch die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphat- und der 3'-Hydroxylgruppe von überstehenden und glatten DNA-Enden. Die Ligation von Vektor-DNA mit DNA-Fragmenten wurde in dem vom Hersteller (Roche) mitgelieferten Puffersystem durchgeführt. Die *insert* DNA sollte gegenüber der Vektor-DNA in einem mehrfachen Überschuss vorhanden sein. Das Endvolumen eines Ligationsansatzes betrug 20 bis 30 µl und beinhaltete neben der DNA 1x DNA-Ligasepuffer, Wasser, sowie 2 Einheiten T4 DNA-Ligase. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16°C. Nach der Ligation konnte der Ansatz direkt zur Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen verwendet werden (3.1.4).

3.2.18 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte je nach erwarteter Fragmentlänge in 0,8 bis 2%-igen (w/v) Agarosegelen in Gelelektrophoresekammern mit 1x TAE (Tris-Acetat-EDTA-Puffer, 50x: 2 M Tris base, 50 mM EDTA, 1 M Eisessig, pH 8,0) als Laufpuffer. Hierfür wurde die Agarose (Sigma) in 1x TAE suspendiert, in der Mikrowelle aufgeköcht und in eine Gelkammer mit passendem Kamm gegossen. Nach Erstarren der Agarose wurden die DNA-Proben mit 1/10 Volumen 10x DNA-Ladepuffer (50% (v/v) Glycerin, 0,35% (v/v) Bromphenolblau, 0,25% (w/v) Xylencanol, 1x TAE) gemischt und in die Geltaschen gefüllt. Zur Abschätzung der Fragmentgrößen diente der Marker O'GENERULER (Fermentas). Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 100 bis 120 Volt je nach Fragmentlänge für 30 bis 90 Minuten. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel für 15 Minuten in einem Bad des interkalierenden Farbstoffes Ethidiumbromid (0,5 µg/ml, Sigma-Aldrich) inkubiert und auf einem UV-Schirm (GEL DOC 2000, Biorad) betrachtet und digital dokumentiert (QUANTITY ONE SOFTWARE, Biorad).

3.2.19 Gelextraktion linearer DNA-Fragmente

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel wurde auch zur Isolierung von DNA mit spezifischer Länge verwendet. Die Bande der entsprechenden Größe wurde mit dem Skalpell ausgeschnitten. Die Isolierung der DNA aus dem herausgelösten Gelstück erfolgte mithilfe des QIAQUICK GEL EXTRACTION KIT (Qiagen) nach Angaben des Herstellers.

3.2.20 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA erfolgte in dem institutseigenen Service-Labor. Das Service-Labor arbeitet mit dem 370A DNA-SEQUENCING SYSTEM (Applied Biosystems) nach

der Dideoxy-Methode (SANGER et al., 1992). Die Zusammensetzung eines Sequenzieransatzes und die Temperaturbedingungen sind in Tabelle 3.6 aufgeführt:

Tabelle 3.6: Komponenten und Temperaturbedingungen eines Sequenzierungsansatzes

DNA (300 ng/μl)	1,0	95°C	2 min	} 1 Zyklus
BigDye-Mix 3.1	2,0	95°C	10 sec	
Primer (10 μM)	0,5	55°C	5 sec	} 25 Zyklen
Puffer	1,5	60°C	4 min	
H ₂ O (Nuklease-frei)	5,0	4°C	∞	

Die Sequenzen lagen anschließend als Datei vor, die mit dem Programm LASERGENE (DNA Star) ausgewertet und bearbeitet werden konnten.

3.2.21 Konstruktion und Markierung kleiner RNA-Sonden

Die Konstruktion und Markierung einer kleinen (29 nt) RNA-Sonde zur Detektion der pol2-siRNA-Expression in PK15-Zellen und Organen der transgenen Ferkel (siehe 3.4.11) erfolgte mit Hilfe des MIRVANA™ MIRNA PROBE CONSTRUCTION KITS (Ambion). Diese Methode basiert auf dem Prinzip der *in vitro*-Transkription (IVT). Als template für die IVT wurde ein der siRNA-Sequenz komplementäres DNA-Nukleotid verwendet, das am 3'-Ende zusätzlich die acht Nukleotide 5'-CCTGTCTC-3' trägt. Diese Sequenz ist komplementär zu dem im Kit vorhandenen T7-Promotor-Primer und ermöglicht somit die Hybridisierung von DNA-Oligonukleotid und T7-Promotor-Primer. Nach Zugabe einer Klenow-DNA-Polymerase entsteht ein doppelsträngiges Transkriptionstemplate, das einen T7-Promotor beinhaltet. Die Transkriptionsreaktion zum Markieren der RNA-Sonde erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Statt der angegebenen α-³²P UTPs (800 Ci/mmol, 10 mCi/ml) wurden α-³²P UTPs (GE Healthcare) mit einer spezifischen Aktivität von 800 Ci/mmol und einer Konzentration von 20 mCi/ml verwendet und dementsprechend nur 2,5 statt 5 μl in die Transkriptionsreaktion eingesetzt, was eine Endkonzentration von 3,125 μM ergab. Im Anschluss an die Markierung der RNA-Sonde musste diese über ein 15%-iges denaturierendes Polyacrylamidgel aufgereinigt werden, um die Vollängen-Sonde von Abbruchfragmenten und nicht eingebauten Nukleotiden zu separieren. Die Visualisierung wurde mit Hilfe des Phospho-Imagers (IMAGINE PLATE TYPE BAS-III, Fujifilm; FLA-2000, Fujifilm) durchgeführt. Zur Detektion der Sonde war eine Expositionszeit von 30 bis 60 Sekunden erforderlich. Die Gelreinigung der Sonde erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Im Folgenden ist die Sequenz der Ziel-RNA (siRNA), die daraus resultierende Sequenz des DNA-templates für die IVT, sowie die entstehende RNA-Sonde und die geschützte Sonden-Sequenz aufgeführt:

Tabelle 3.7: Konzipierung der pol2-shRNA-Sonde

Ziel-RNA für die Sonde: (= pol2-shRNA)	5' agucauuugucagcgucc 3'
DNA- <i>template</i> :	5' AGTCAATTTGTCAGCGTCC cctgtctc 3'
entstehende RNA-Sonde:	3' UCAGUUAACAGUCGAGG ggacagag gg* 5'
geschützte Sequenz (mirVana):	3' UCAGUUAACAGUCGAGG 5'

___ : T7 Promotor Sequenz

* : 2 zusätzliche Guanidine, die während der Transkriptionsreaktion angehängt werden

3.2.22 Kalkulation der theoretischen spezifischen Aktivität der RNA-Sonde

Die theoretische spezifische Aktivität der RNA-Sonde wurde mit Hilfe eines Kalkulationsprogramms der Firma Ambion (http://www.ambion.com/techlib/tips/specific_activity_calculator.html) ermittelt.

3.2.23 Detektion von siRNAs

Die siRNA-Detektion erfolgte mit Hilfe des MIRVANA MIRNA DETECTION KITS (Ambion), welches auf dem Prinzip einer „In-Lösung-Hybridisierung“ basiert. Die Ziel-RNA enthaltende RNA-Probe wurde mit einer ³²P-markierten RNA-Sonde und dem Hybridisierungspuffer gemischt. Nach einer Hitzedenaturierung wurde die Mischung einer Inkubation bei 42°C unterzogen, während derer die Sonde an ihre komplementäre Sequenz binden konnte. Nicht hybridisierte RNA und überschüssige Sonde wurden anschließend mittels eines RNase-Verdau entfernt. Die hybridisierten und somit geschützten RNA-Fragmente wurden einer Ribonuklease-Inaktivierung und einer Nukleinsäure-Präzipitation unterzogen. Anschließend konnten die RNA-Proben in Gel-Ladepuffer resuspendiert und durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Phosphoimaging (IMAGINE PLATE TYPE BAS-III UND FLA-2000, Fujifilm) analysiert werden. Die Prozedur erfolgte exakt nach den Angaben des Herstellers. Zur Detektion der siRNAs war eine Expositionszeit von 3 bis 7 Minuten erforderlich.

3.2.24 Präzipitation von DNA an Goldpartikel

Für die DNA-Vakzinierung wurde das HELIOS GENE GUN SYSTEM (Bio-Rad) eingesetzt und nach Herstellerangaben verwendet. Die Plasmid-DNA wurde mit CaCl₂ an Goldpartikel (Alfa Aesar) präzipitiert, um damit die Innenwand des Patronenschlauchs zu beschichten. Die empfohlenen Standardwerte (0,5 mg Gold pro Patrone, 2 mg DNA pro mg Gold) wurden beibehalten.

25 mg Goldpartikel wurden in 100 µl 50 mM Spermidin resuspendiert (5 Sekunden im Ultraschallbad) und dann mit 50 µg Plasmid gemischt. Unter Vortexen erfolgte die Zugabe von 100 µl 1 M CaCl₂. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei RT wurde die Goldpartikel kurz in einer Tischzentrifuge pelletiert (14000 x g, 15 s) und 3 mal mit je 1 ml 100 % Ethanol (wasserfrei aus frisch geöffneten Flaschen) gewaschen. Für die Beschichtung des Schlauchs wurden die Goldpartikel in 100 % Ethanol mit 0,015 mg/ml PVP in ein 15 ml Röhrchen überführt (Gesamtvolumen 3,0 ml).

Der 75 cm lange Patronen-Schlauch wurde zunächst in der Beschichtungs-Vorrichtung mit hochreinem N₂ (mindestens Grad 4.8) für 15 min getrocknet. Anschließend wurde die gesamte Gold-Ethanol-Suspension in den Schlauch gesaugt und der Schlauch bei abgeschalteter N₂-Strömung wieder in die Vorrichtung eingesetzt. Nach dem Absetzen der Goldpartikel (3 bis 5 min), wurde der Ethanol-Überstand vorsichtig abgesaugt und der Schlauch unter Rotation für 5 Minuten mit N₂ (0.4 l/min) getrocknet. Anschließend erfolgte das Zuschneiden des Schlauches zu 1 cm langen Patronen, die bei 4°C im Exikator gelagert wurden.

3.3 Proteinchemische Arbeiten

3.3.1 Isolierung von Gesamtprotein aus eukaryontischen Zellen und Geweben

Zur Gewinnung von Gesamtprotein aus eukaryontischen Zellen und Geweben wurde die verbliebene organische Phase aus der RNA- bzw. DNA-Isolierung mittels TRI REAGENT (Sigma-Aldrich) verwendet (vgl. 3.2.7, 3.2.2). Aus dieser wurden die Proteine nach den Angaben des Herstellers mit Isopropanol (Roth) ausgefällt, aufgereinigt und bis zur weiteren Verwendung in 1% (w/v) SDS bei -20°C gelagert.

Sollte aus eukaryontischen Zellen ausschließlich Gesamtprotein isoliert werden, wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit eiskaltem RIPA-Puffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 7,2), 0,1% (w/v) SDS, 1% (v/v) Triton X-100, 1% (w/v) Deoxycholat, 5 mM EDTA, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 10 mM Benamidin, 2 µg/ml Leupeptin, 100 µM Natrium-orthovanadat, 10 mM p-Nitrophenylphosphat) resuspendiert. Nach einer zehnmütigen Inkubation auf Eis wurden die unlöslichen Bestandteile sedimentiert (10000 x g, 10 min, 4°C, CENTRIFUGE 5415D, Eppendorf) und der Proteingehalt des Überstandes quantifiziert (siehe 3.3.2). Bis zur weiteren Verwendung wurde das isolierte Proteingemisch bei -20°C gelagert.

3.3.2 Bestimmung des Proteingehaltes

Bradford-Bestimmung

Zur Herstellung einer Eichgeraden diente ein BSA-Standard (Pierce) mit den Konzentrationen 1200 µg/ml, 1000 µg/ml, 800 µg/ml, 600 µg/ml, 400 µg/ml, 200 µg/ml. Zu den in einer 96-well-Mikrotiterplatte vorgelegten 4 µl des BSA-Standards, der Nullkontrollen und der Proben wurden jeweils 196 µl Bradford-Reagenz (Biorad) hinzu gegeben. Nach einer Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Extinktionen bei einer Wellenlänge von 595 nm im ELISA-READER (Tecan) vermessen und die Proteinkonzentrationen anhand einer Eichgeraden des BSA-Standards bestimmt.

BCA-Bestimmung

Für die Konzentrationsbestimmung von Proteinproben in 1% SDS wurde der BCA Protein Assay (Pierce) herangezogen. Diese Methode verbindet die Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch Proteine in alkalischer Umgebung (Biuret-Reaktion) und die selektive colorimetrische Quantifizierung von Cu^{1+} durch die Reaktion mit Bicinchinonischer Säure. Nach Herstellung der Gebrauchslösung (50 Teile Reagenz A, 1 Teil Reagenz B) wurden 200 µl von dieser zu den in einer 96-well-Mikrotiterplatte vorgelegten 10 µl des BSA-Standards (siehe Bradford-Bestimmung), der Nullkontrollen und der Proben hinzugegeben. Nach einer dreißigminütigen Inkubation bei 37°C wurden die Extinktionen bei einer Wellenlänge von 570 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 492 nm im ELISA-READER (Tecan) vermessen und die Proteinkonzentrationen im Vergleich zur Eichgeraden des BSA-Standards bestimmt. Um eventuelle Messfehler gering zu halten, wurden jeweils Dreifachbestimmungen angefertigt.

Optische Quantifizierung:

Lagen Proteine in einer unlöslichen Form vor, wurde auf eine Quantifizierung im Vergleich zu einer Lysozym- bzw. BSA-Ausverdünnung in einem Polyacrylamidgel zurückgegriffen.

Hierfür wurde ein definiertes Volumen der Proteinsuspension neben einer definierten Lysozym- bzw. BSA-Ausverdünnung in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Hilfe der QUANTITY ONE SOFTWARE (Biorad) quantifiziert.

3.3.3 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine

Zur rekombinanten Herstellung von Proteinen gibt es verschiedene kommerziell erhältliche Systeme mit aufeinander abgestimmten Expressionsvektoren, bakteriellen Expressionsstämmen und Aufreinigungssystemen.

Je nach Beschaffenheit des zu exprimierenden Proteins stehen unterschiedliche *tags* oder Fusionsproteine zur affinitätschromatografischen Aufreinigung zur Verfügung. Für die Expression der viralen Hüllproteine wurden die Expressionsvektoren pET-22b(+) (Novagen) und pGEX-5X-1 (Stratagene) verwendet. Durch einen zusätzlich eingebrachten C-terminalen 6x His-Tag, eine Sequenz von 6 Histidinen in Folge, wurde die affinitätschromatografische Aufreinigung der Proteine über eine Nickel-NTA (nitrilotriacetic acid)-Matrix ermöglicht.

3.3.3.1 IPTG-induzierte Expression

Das in den Vektor pET-22b(+) eingebrachte Gen des Zielproteins steht unter der Kontrolle eines *lac*-Promotors, der die gezielte Transkription eingefügter Sequenzen durch die Zugabe des Galaktoseanalogons Isopropylthiogalaktopyranosid (IPTG) erlaubt. IPTG ist ein nicht metabolisierbarer Induktor, der durch die Bindung an den Repressor die Transkription der *lac*-Strukturgene und damit auch des eingeführten *inserts* ermöglicht. Die Expression erfolgte in dem *E. coli*-Stamm BL21-CodonPlus(DE3) (Stratagene). Dazu wurden 500 ml auf 37°C vorgewärmtes LB-Amp-Medium mit 1 ml einer frischen Vorkultur (siehe 3.1.2) inokuliert und bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch die Zugabe von IPTG (Roth) (PERV-gp70 und KoRV-gp70: 0,5 mM Endkonzentration, gp70-Fragmente: 1 mM Endkonzentration) bei einer optischen Dichte von 0,8 bei einer Wellenlänge von 600 nm. Nach einer über Nacht-Inkubation der Expressionskultur schüttelnd bei 4°C wurden die Bakterien bei 3200 x g pelletiert (MEGAFUGE 1.0 R, Heraeus), der Überstand dekantiert und das Bakterienpellet bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.3.3.2 Aufschluss der Bakterien

Zum Aufschluss der *E. coli*-Zellwände wurde das bei -20°C gelagerte Zellpellet 15 Minuten auf Eis aufgetaut und anschließend in 5 ml Lysepuffer (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 6 M Guanidinhydrochlorid, pH 8,0) pro Gramm Gewicht resuspendiert. Zur Lyse wurde die Zellsuspension 15 bis 60 Minuten bei Raumtemperatur unter Vermeidung von Schaumbildung geschüttelt. Um die Proteinfraktion von Zelltrümmern zu trennen, wurden diese für 30 Minuten bei 10000 x g und Raumtemperatur sedimentiert (CENTRIFUGE 5415D, Eppendorf) und das Lysat für die Proteinaufreinigung eingesetzt.

3.3.3.3 Affinitätschromatografische Aufreinigung rekombinanter Proteine

Eine Chromatographiesäule (Amersham Bioscience) wurde mit 3 ml PROBOND Ni-NTA-SEPHAROSE (Invitrogen) mit dem fünffachen Säulenvolumen Lysepuffer (3.3.3.2) äquilibriert. Das Proteinlysate (3.3.3.2) wurde auf die Säule gegeben und mit einer

Flußrate von 1 ml pro Minute 2 h rezirkuliert. Am Tag darauf wurde die Säule mit dem zwanzigfachen Säulenvolumen Waschpuffer (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 6 M Guanidinhydrochlorid, pH 6,3) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 20 ml eines Elutionspuffers mit geringerem pH-Wert (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 6 M Guanidinhydrochlorid, pH 4,0). Der Proteingehalt der Fraktionen wurde durch photometrische Messung (Biophotometer, Eppendorf) bei einer Wellenlänge von 280 nm abgeschätzt und die proteinreichen Fraktionen vereint und über Nacht in einem Servapor Dialyseschlauch mit einer Molekulargewichtsgrenze von 12000 bis 14000 kDa (Serva) gegen PBS dialysiert.

3.3.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Proteinproben (*E.coli*-Lysate, Zellysate, aufgereinigte Proteine, etc.) wurden in SDS-Probenpuffer (50 mM Tris-HCl, 12 % (v/v) Glycerin, 4% (w/v) SDS, 0,01% (v/v) Coomassie Blue R-250, 5% (v/v) Mercaptoethanol) aufgenommen und für 5 bis 10 Minuten bei 95°C aufgekocht. Die hier verwendeten SDS-Gele setzten sich aus einem 4% Sammelgel und einem 10% Trenngel zusammen (nach SCHÄGGER UND VON JAGOW, 1987). Ein kommerzieller, vorgefärbter Größenstandard (SEEBLUE PLUS II, Invitrogen, bzw. PAGERULER, Fermentas) wurde mitgeführt. Das Gel wurde in das MIGHTY SMALL II SYSTEM (Hoefler) eingespannt und die Elektrophoresekammer mit Kathoden- (100 mM Tris-Base, 100 mM Tricin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,25) und Anodenpuffer (200 mM Tris-HCl, pH 8,9) befüllt. Die Elektrophorese erfolgte bei 60 mA für ca. 2 Stunden. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel entweder durch einen Elektroblot auf eine Membran übertragen (Western Blot-Analyse, 3.3.7) oder direkt mit Coomassie Blue (siehe 3.3.5) gefärbt.

Tabelle 3.8: Komponenten eines Sammel- und Trenngels für die SDS-Acrylamidgelelektrophorese

4% Sammelgel		10% Trenngel	
2,0 ml	Gelpuffer (0,1 M Tris-HCl, 0,3% (w/v) SDS, pH 8,0)	5,0 ml	Gelpuffer (0,1 M Tris-HCl, 0,3% (w/v) SDS, pH 8,0)
3,2 ml	H ₂ O	6,0 ml	H ₂ O
0,8 ml	ROTIPHORESE GEL ®30 (30% Acrylamidlösung, 37,5:1, Roth)	4,0 ml	ROTIPHORESE GEL ®30 (30% Acrylamidlösung, 37,5:1, Roth)
10 µl	TEMED (USB)	10 µl	TEMED (USB)
100 µl	Ammoniumpersulfat (10%)	100 µl	Ammoniumpersulfat (10%)

3.3.5 Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen

Die in einem Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden mit COOMASSIE BRILLIANT BLUE R-250 (Serva) angefärbt, welches sich irreversibel an Proteine anlagert. Durch anschließende Entfärbung werden die proteinfreien Bereiche des Gels wieder entfärbt. Hierfür wurde das Polyacrylamidgel für 5 bis 15 Minuten unter leichtem Schwenken auf dem Schüttler in Coomassie-Färbelösung (3 mM Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure) inkubiert. Die spezifischen Proteinbanden wurden nach etwa 20-minütigem Entfärben in Entfärbelösung (25% (v/v) Methanol, 10% (v/v)

Essigsäure) sichtbar. Zur Aufbewahrung wurde das Gel über Nacht in Wasser geschwenkt, anschließend mit Hilfe der GEL-DRY DRYING SOLUTION (Invitrogen) entwässert und zwischen zwei Zellophan-Folien getrocknet.

3.3.6 Detektion von Glykoproteinen

Um zu prüfen, ob die hergestellten Proteine im Periplasma einer bakteriellen Glykosilierung unterlaufen, wurden diese in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese ihrer nach Größe aufgetrennt. Mit Hilfe einer speziellen Färbung des Gels wurden dann spezifisch Glykoproteine angefärbt. Die Färbung erfolgte mit dem GELCODE GLYCOPROTEIN STAINING KIT (PIERCE) nach den Angaben des Herstellers. Es wurden jeweils 20 µg Protein eingesetzt.

3.3.7 Western-Blot-Analyse

Die Western-Blot-Analyse ist eine Methode zur Detektion von auf einer Trägermembran immobilisierten Proteinen mit spezifischen Antikörpern und einer Enzym-gekoppelten Nachweisreaktion [TOWBIN et al. 1989].

Nach der Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE wurden diese mit Hilfe der TRANSBLOT SEMI-DRY TRANSFER CELL (Biorad) Apparatur durch ein senkrecht zum Gel orientiertes elektrisches Feld (20 V, 20 min) auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid, Porengröße 0,2µm, Millipore) transferiert. Das Gel sowie drei Blotting-Filterpapiere (Peqlab) wurden zuvor in Transferpuffer (48 mM Tris, 39 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol, 0,038% (v/v) SDS) äquilibriert. Freie Bindungsstellen auf der Membran, die nicht durch Proteine besetzt waren, wurden durch eine einstündige Inkubation der Membran in einer Blockierungslösung (5% (w/v) Magermilchpulver (Sucofin), 0,05% (v/v) Tween 20 (Roth) in PBS) abgesättigt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper (bzw. dem Antiserum, Verdünnungen siehe Tabelle 2.6) für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges je zehnmütiges Waschen mit Waschpuffer (0,05% (v/v) Tween 20 in PBS) entfernt. Im Anschluss wurde die Membran für 1 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur mit einem Spezies-spezifischen, Peroxidase(POD)-konjugierten Sekundärantikörper (DakoCytomation) inkubiert. Die Verdünnung der Sekundärantikörper erfolgte in Blockierungslösung nach Angaben des Herstellers (Tab. 2.6). Nach drei weiteren Waschschritten erfolgte die Detektion entweder nach der ECL-Methode (*enhanced chemilumineszenz*, ECL WESTERN BLOTTING SUBSTRATE, Pierce) und einem Röntgenfilm (CL-XPOSURE FILM 5 x 7, Pierce) nach Angaben des Herstellers oder mit einer 3,3'-Diaminobenzidin-Substratlösung (DAB, Sigma-Aldrich) in Gegenwart von Wasserstoffperoxid (Merck). Hierzu wurde die Membran in eine DAB-Substrat-Lösung aus 20 ml Tris-Puffer (25 mM, pH 8,0) einer Spatelspitze DAB und 50 µl Wasserstoffperoxid inkubiert. Sobald Banden zu erkennen waren, wurde die Farbreaktion mit Wasser abgestoppt und die Membran getrocknet.

Nach der ECL-Detektion bestand die Möglichkeit, die Membran erneut zu verwenden. Hierzu mussten jedoch die gebundenen Antikörper abgelöst werden. Dies geschah nach einem Waschschriff in Waschpuffer durch eine 30 bis 90-minütige Inkubation der Membran in „Strippingpuffer“ (62,5 mM Tris-HCl, 2% (w/v) SDS, 100 mM β-

Mercaptothanol, pH 6,8) bei 50 bis 65°C. Nach zwei weiteren Waschschritten wurde die Membran getrocknet und bis zur weiteren Verwendung trocken bei RT gelagert.

Zur Analyse verschiedener Seren hinsichtlich ihrer Immunreaktion gegen identische Antigene wurde die Apparatur MINI-PROTEAN II MULTISCREEN APPARATUS (Biorad) verwendet. Diese ermöglichte die Testung von bis zu 20 unterschiedlicher Seren auf einer Membran.

3.3.8 Kolonie-Blot

Der Kolonie-Blot stellt eine einfache Methode zur Auslese positiver Expressionsklone dar und bietet erste Anhaltspunkte hinsichtlich eventueller zytotoxische Eigenschaften des rekombinanten Proteins. Die Durchführung erfolgte nach dem im QiaExpressionisten (S. 41-44) angegebenen Protokoll.

Zunächst wurde das aus *E. coli* TOP 10 isolierte Plasmid in den Expressionsstamm *E. coli* BL21 transformiert. Dabei wurde die Selektivplatte statt bei 37°C bei 30°C für ca. 16 bis 36 Stunden inkubiert, um eventuelle zellschädigende Eigenschaften des rekombinanten Proteins zu minimieren. Danach erfolgte ein Abdruck der Kolonien auf eine an die Platte angepasste Nitrozellulose-Membran. Diese wurde auf eine IPTG-haltige Nährbodenplatte überführt und für 4 Stunden bei 37°C inkubiert, wodurch die Expression induziert werden sollte. Es folgte die Lyse der Zellen mit den angegebenen Puffern (QiaExpressionist S. 111); PBS anstelle von TBS), gefolgt von einer Sättigung der freien Bindungsstellen mit Blockierungspuffer (12 h bei 4°C). Im weiteren Verlauf wurde die Membran wie bei der Western-Blot-Analyse (siehe 3.3.7) behandelt. Die Detektion des rekombinanten Proteins erfolgte mit Hilfe eines α -Penta-His-Antikörpers.

3.3.9 ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay)

Neben der Western-Blot-Analyse wurde auch der ELISA zur spezifischen Detektion von Antikörpern genutzt. Der Nachweis basiert, wie bei der Western-Blot-Analyse, auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion, die durch einen Spezies-spezifischen POD-konjugierten Sekundärantikörper quantifiziert werden kann.

Im Vergleich zur Western-Blot Analyse-ermöglicht der ELISA zusätzlich zur spezifischen Detektion die Titerbestimmung der im Serum enthaltenen bindenden Antikörper sowie die Bestimmung der Avidität monoklonaler Antikörper oder Antiseren zu ihrem Antigen.

Um Seren auf bindende Antikörper zu testen, wurden zunächst die entsprechenden in H₂O gelösten rekombinanten Proteine (Antigene) auf eine NUNC PROBIND™-96-WELL-PLATTE (Nunc) aufgebracht und über Nacht bei 37°C eingetrocknet. Ungesättigte Bindungsstellen auf der Plattenoberfläche wurden durch eine einstündige Inkubation mit 200 μ l Blockierungspuffer pro well (10% (v/v) FKS in PBS) blockiert. Anschließend wurde die Platte dreimal mit 300 μ l Waschpuffer (PBS, 0,05% (v/v) Tween 20) pro well in einem ELISA-WASHER (Tecan) gewaschen. Es folgte eine zweistündige Inkubation der zu testenden Seren (Primärantikörper) in entsprechender Verdünnung (Tab. 2.6) in 100 μ l Waschpuffer bei 37°C. Ungebundene Antikörper wurden durch drei Waschzyklen entfernt. Anschließend erfolgte eine zweistündige Inkubation der Platte mit dem Spezies-spezifischen POD-konjugierten Sekundärantikörper in der vom Hersteller angegebenen Verdünnung (Tab. 2.6) in Blockierungspuffer bei 37°. Ungebundene Sekundärantikörper wurden durch fünf Waschzyklen entfernt. Nach dem Waschen wurde die Platte durch kräftiges Ausschlagen von allen Flüssigkeitsresten befreit und mit 50 μ l pro Well

Substratlösung (PBS pH 6,0; 1mg/ml o-Phenylendiamin-Dihydrochlorid, Sigma-Aldrich) inkubiert bis eine deutliche Farbreaktion festzustellen war (1 bis 15min). Durch die Zugabe von 25 µl Schwefelsäure (Merck) pro Well wurde die enzymatische Substratumsetzung gestoppt und die Farbreaktion mit einem ELISA-READER (Tecan) bei Wellenlängen von 492 nm und 620 nm quantifiziert. Alle Ansätze wurden in Triplikaten gemessen. Mittelwerte und Standardabweichungen der Triplikate wurden mit dem Tabellenkalkulations-Programm MICROSOFT EXCEL berechnet.

Zur Bestimmung der Titer spezifischer Antikörper in Seren nach einer Immunisierung wurden die Seren gegen die entsprechenden Präimmunseren ausverdünnt. Der Titer eines Serums entspricht der letzten Verdünnungsstufe, bei der die Absorption signifikant über dem Hintergrund durch das Präimmunserum liegt.

3.3.10 Nachweis der Aktivität Reverser Transkriptase (RT)

Ein Charakteristikum von Retroviren ist die Reverse Transkriptase, ein Enzym, welches das retrovirale RNA-Genom während der Replikation in provirale DNA umschreibt. Die Messung der Aktivität dieses Enzyms in Überständen kultivierter Zellen ermöglicht den Nachweis retroviraler Infektionen bzw. die Quantifizierung freigesetzter Viruspartikel. Der Nachweis der Reversen Transkriptase erfolgte mit Hilfe des C-TYPE RT ACTIVITY KITS (Cavidi). Dieses System ermöglicht die Quantifizierung der Mangan-abhängigen RT-Aktivität von γ -Retroviren. Es basiert auf der Kopplung von Poly-rA (ein Substrat der RT) und einem Oligo-dT-Primer an eine Mikrotiterplatte. Je nach Konzentration der zugegebenen Reversen Transkriptase erfolgt eine Verlängerung des Oligo-dT-Primers mit Bromodesoxyuridin, welches seinerseits mit Hilfe eines spezifischen, mit Alkalischer Phosphatase-konjugierten Antikörpers und einer Substratlösung photometrisch gemessen und quantifiziert werden kann. Der Nachweis der Reversen Transkriptase erfolgte nach dem „Über-Nacht“-Protokoll des Herstellers.

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen

Die Kultivierung aller eukaryontischen (Tab. 2.8) Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen bei 37°C, 5% CO₂-Gehalt und wasserdampfgesättigter Atmosphäre in einem Brutschrank (BBD 6220, Heraeus). Sämtliche Zellkultur-Arbeiten wurden unter der Sterilbank HERASAFE (Heraeus) durchgeführt.

Die Medien DMEM inkl. 4,5 g/L Glukose (Biochrom KG) und RPMI (Invitrogen) wurden jeweils mit den in Tabelle 3.9 aufgeführten Supplementen versetzt. Das Medium für die Kultivierung der porzinen Fibroblasten enthielt zusätzlich 0,1 mM β -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich), 1% (v/v) *non essential amino acids* (Sigma) und 1% (v/v) *vitamin solution* (Sigma-Aldrich).

Zum Erhalt der Zellen wurden diese alle 2 bis 3 Tage passagiert. Hierfür wurde das Medium verworfen und die Zellen mit 10 ml 37°C warmem PBS gewaschen.

Tabelle 3.9: Supplemente der Medien DMEM und RPMI

Konzentration	Supplement
10% (v/v)	FKS (Biochrom)
2 mM	L-Glutamin (200 mM, Biochrom)
100 U/ml	Penicillin (10000 U/ml, Biochrom)
100 µg/ml	Streptomycin (10 mg/ml, Biochrom)
15 mM	HEPES (1 M, Biochrom)

Um die adhärennten Zellen vom Boden der Kulturschale zu lösen, wurden sie anschließend 3 bis 4 Minuten mit Trypsin/EDTA (Biochrom) bei 37°C inkubiert, in frischem, vorgewärmten Medium resuspendiert und in neue Zellkulturschalen oder -flaschen (TPP) verteilt. Das Umsetzungsverhältnis variierte je nach Zelldichte zwischen 1:2 und 1:8. Zum Ablösen der porzinen foetalen Fibroblasten wurde ein Zellschaber verwendet (TPP).

3.4.2 Kryokonservierung eukaryontischer Zellen

Die langfristige Lagerung von Zellen über mehrere Jahre ist nur in flüssigem Stickstoff bei -196°C möglich. Um zu gewährleisten, dass möglichst wenige Zellen in Folge der Bildung von Eiskristallen im Zellinneren beim Einfrierprozess Schaden nehmen, müssen diese mit Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich) versetzt werden. Die Zellen wurden in Suspension gebracht, vereinzelt und bei 500 x g für 5 Minuten pelletiert (MEGAFUGE 1.0 R, Heraeus). Bis zu 2×10^6 Zellen wurden in 1 ml vorgekühltem FKS (Biochrom) mit 10% DMSO (Sigma-Aldrich) aufgenommen und in ein 2 ml Kryogefäß (Greiner Bio One) überführt. Die Kryogefäße wurden für einige Stunden bei -20°C eingefroren und dann in einer verschlossenen Styroporbox bei -80°C über Nacht gelagert. Am nächsten Tag wurden die Zellen in katalogisierter Position in einen Stickstofftank überführt. Auf diese Weise wurde ein langsamer Zell-schonender Einfrierprozess gewährleistet.

Zur Weiterkultivierung wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und langsam mit 10 ml 37°C warmem Medium ausverdünnt. Das restliche DMSO und abgestorbene Zellen wurden durch einmaliges abzentrifugieren der Zellen für 2 Minuten bei 500 x g entfernt. Nach Resuspension des Zellpellets in 13 ml Medium wurde das gesamte Volumen in einer 75 cm² Kulturflasche ausgesät und unter oben beschriebenen Zellkulturbedingungen inkubiert.

3.4.3 Bestimmung der Vitalität und der Zellzahl mit Trypanblau

Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, dessen Anion an Zellproteine bindet. Das Trypanblau dringt durch defekte Zellmembranen toter Zellen in das Cytosol ein und färbt die Zellen tiefblau. Lebende Zellen erscheinen unter dem Mikroskop leuchtend hell. Bei zu langer Einwirkzeit des Trypanblau ist ein Anstieg von toten Zellen zu beobachten, da dieser Farbstoff cytotoxisch wirkt. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer können Zellen somit auf ihre Vitalität überprüft und gleichzeitig die Gesamtzellzahl ermittelt werden. Hierzu wurden gleiche Volumina (10 µl) Zellsuspension und 0,4% Trypanblau-Lösung (Sigma-Aldrich) gemischt und in einer Zählkammer gezählt. Durch Auszählen der Zellen in allen vier Großquadranten kann die Gesamt-Zellzahl wie folgt berechnet werden:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \frac{\text{gezählte Zellzahl} \times 2}{4} \times 10^4$$

3.4.4 Isolierung porziner PBMC (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)

Die Gewinnung von PBMC erfolgte nach der Methode der Dichtegradientenzentrifugation mit dem Lymphozytenseparationsmedium Ficoll. Bei der Zentrifugation des Ficollgradienten entstehen vier Phasen: eine obere Plasma-Phase, eine darunter liegende weißliche Bande, welche die Lymphozyten und Monozyten enthält, gefolgt von einer Ficoll-Schicht, unterhalb dieser sammeln sich Erythrozyten und Granulozyten an.

Als Ausgangsmaterial wurde porcines heparinisiertes Vollblut verwendet. In einem konischen 50 ml Röhrchen (TPP) wurden 10 ml Ficoll (PAA) vorgelegt und vorsichtig mit 10 ml Blut überschichtet. Die Phasentrennung erfolgte durch eine zwanzigminütige Zentrifugation bei 800 x g ohne Bremse (MEGAFUGE 1.0 R, Heraeus). Die Interphase zwischen der Plasma- und der Ficollschicht wurde mit einer sterilen Pipette isoliert, in ein neues Falcon überführt und mit sterilem PBS auf 50 ml aufgefüllt. Es folgte eine Zentrifugation (340 x g, 10 min, RT) und die anschließende Entfernung des Überstandes. Dieser Waschschrift wurde drei Mal wiederholt. Abschließend wurden die isolierten PBMC in RPMI-1640 (Invitrogen) resuspendiert, einer Zellzahlbestimmung unterzogen und in den jeweiligen Versuch eingesetzt.

3.4.5 Mitogen-Stimulation porziner PBMCs

Zur Simulation einer Antigen-induzierten Aktivierung von PBMCs im Zuge einer Xenotransplantation wurden porcine PBMCs mit dem Mitogen Phytohämagglutinin stimuliert. Hierfür wurden je 1×10^6 PBMCs pro 24er well in RPMI ausplattiert und mit 80 µg/ml PHA stimuliert. Der Versuchsansatz erfolgte jeweils in Triplikaten. Für alle PHA-stimulierten PBMC-Ansätze wurden zur Kontrolle jeweils unstimulierte PBMCs mitkultiviert. Nach einer Inkubationszeit von 5 Tagen wurde der Zellkulturüberstand für die Bestimmung der RT Aktivität (3.3.10) abgenommen und bei -80°C gelagert. Aus den stimulierten und unstimulierten PBMCs wurde zur Bestimmung der PERV-Expression RNA isoliert (3.2.7).

3.4.6 Transfektion eukaryontischer Zellen mit Plasmid-DNA

Unter einer Transfektion versteht man das Einbringen von DNA oder RNA in eukaryotische Zellen. Dabei wird zwischen dem nur zeitweiligen Einbringen des Plasmids in die Wirtszelle (transiente Transfektion) und dem dauerhaften Einbau in das Genom (stabile Transfektion) unterschieden. Je nach Zellart eignen sich verschiedene Verfahren. Für adhärente Zellen empfiehlt sich der Einsatz der Lipofektion oder der Kalziumphosphatpräzipitation. Aufgrund der negativen Ladung der Nukleinsäuren kommt es zu elektrostatischen Wechselwirkungen der kationischen Lipide mit der DNA, was eine Fusion der DNA-Liposomen-Komplexe mit der Zellmembran ermöglicht. Bei der Kalziumphosphatpräzipitation hingegen bindet die Plasmid-DNA an ausgefallenes Kalziumphosphat einer u.a. aus Kalziumchlorid und Natriumphosphat bestehenden Lösung. Diese DNA-Kalziumphosphat-Kristalle können von der Zelle durch Endozytose aufgenommen werden.

Zur Transfektion eukaryontischer Zellen mit Hilfe kationischer Liposomen wurde das Transfektionsreagenz LIPOFECTAMINE 2000 (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Zur Transfektion mittels Kalziumphosphatpräzipitation wurden die Zellen einen Tag zuvor in einer Zelldichte von 2×10^6 pro 10 cm Petrischale (TPP) ausgesät, so dass sie am Tag der Transfektion Konfluenz von ca. 30% aufwiesen. Die verwendeten Lösungen wurden unter sterilen Bedingungen vorbereitet. 40 µg Plasmid-DNA wurden mit 500 µl 250 mM CaCl_2 vermischt, tropfenweise unter ständigem Mischen zu 500 µl 2x HBS-Puffer (280 mM NaCl, 10 mM KCl, 1,5 mM Na_2HPO_4 , 42 mM HEPES, 11 mM Glukose, pH 7,05) gegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit bildeten sich die Präzipitate. Dieses Gemisch wurde anschließend tropfenweise zu den Zellen hinzugegeben und gemischt. Nach 6 bis 8 Stunden Inkubation der Zellen mit der Transfektionslösung wurde das präzipitathaltige Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versetzt.

3.4.7 Herstellung lentiviraler Partikel

Die Verwendung lentiviraler Partikel ermöglicht einen effektiven Gentransfer auf schlecht transfizierbare eukaryontische Zellen und die Integration sowie die stabile Expression des Transgens. Hierbei können sowohl sich teilende als auch sich nicht teilende Zellen transduziert werden. Aus Sicherheitsgründen ist die genetische Information der viralen Proteine und die des Transgens auf mehrere Plasmide verteilt. Auf diese Weise wird eine mögliche Rekombination verhindert. Zur Herstellung lentiviraler Partikel wurden Zellen der humanen embryonalen Nierenzelllinie 293T mit drei Plasmiden kotransfiziert: dem Transfektorvektor pLVTHM, einem Verpackungsplasmid psPAX2 und einem Hüllplasmid pCL-VSV-G. Der Transfektorvektor pLVTHM besitzt zwei Promotoren, von denen der eine die Expression des GFPs und der andere die Expression der eingebrachten shRNA steuert. Das Verpackungsplasmid psPAX2 basiert auf dem Stamm 1 des Humanen Immundefizienz Virus (HIV-1). Das Core des lentiviralen Partikels sowie die enzymatischen Komponenten stammen von HIV-1, während das Hüllprotein, welches auf dem Hüllplasmid pCL-VSV-G kodiert ist, aufgrund seiner hohen Stabilität und seinem breiten Wirtstropismus vom Vesicular Stomatitis Virus (VSV) abgeleitet wurde.

Für die Transfektion wurden am Vortag $2,5 \times 10^6$ 293T Zellen in 10 cm Petrischalen (TPP) ausplattiert. Die Transfektion erfolgte mittels Kalziumphosphatpräzipitation (siehe 3.4.6). Die verwendeten Mengen an endotoxinfreier Plasmid-DNA sind in der folgenden Tabelle aufgeführt. 72 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellkulturüberstände abgenommen, bei 1800 x g (MEGAFUGE 1.0 R, Heraeus) zur Pelletierung von Zellen und Zelltrümmern für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und mit Hilfe eines Filters mit einer Porengröße von 0,45 µm (Schleier & Huell) sterilfiltriert. Anschließend erfolgte eine Konzentrierung der lentiviralen Partikel mit Hilfe einer Ultrazentrifuge. Hierfür wurden je 33 ml des Zellkulturüberstandes in konische 33 ml fassende Zentrifugenröhrchen (Beckman) überführt und bei 26000 rpm und 4°C für 2 Stunden sedimentiert (ULTRAZENTRIFUGE L8-70, Beckman; Rotor SW28). Nach vorsichtigem Abnehmen des Überstandes wurde das Viruspellet über Nacht mit 100 µl kaltem PBS inkubiert, anschließend resuspendiert und in 30 µl-Aliquots bei -80°C gelagert.

Tabelle 3.10: Plasmide für die Herstellung lentiviraler Partikel

Plasmid	Bezeichnung	zu transfizierende Menge
Transfervektor	PLVTHM	20 µg
Verpackungsplasmid	psPAX2	15 µg
Hüllplasmid	pCL-VSV-G	6 µg

3.4.8 Bestimmung des Titers lentiviraler Vektoren

Um bei späteren Transduktionsversuchen stets vergleichbare Mengen Virus einzusetzen, wurde der Titer der hergestellten lentiviralen Vektoren bestimmt. Die Titration basierte auf der Messung der GFP-Expression transduzierter Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie (3.4.10). Die lentiviralen Partikel kodieren u.a. das Gen EGFP und transferieren dieses in die Zielzellen. Auf diese Weise konnte die Zahl der GFP-exprimierenden Zellen eines Transduktionsansatzes analysiert und ein entsprechender Titer berechnet werden.

Für die Titration der lentiviralen Partikel wurden 4×10^5 293-, HeLa-Zellen oder porcine Fibroblasten pro Well einer 6-Well-Platte ausgesät und bei 37°C inkubiert. Am Tag darauf wurde das Medium gegen frisches ersetzt und unterschiedliche Volumina (100 µl, 50 µl, 10 µl, 1 µl, 0,1 µl und 0,01 µl) der konzentrierten Virussuspension (siehe 3.4.7) und Polybrene (Hexadimethrine Bromid 10 µg/ml, Sigma-Aldrich) hinzugegeben. Nach 16 Stunden wurde das Medium erneut gewechselt und die Zellen für weitere 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen abgelöst, mit 2,7% Formaldehyd (Merck) in PBS fixiert und mit Hilfe des Durchflusszytometers (FACS Calibur, Beckton Dickinson) analysiert. Der Virustiter wurde näherungsweise nach folgender Formel für jedes eingesetzte Volumen Virussuspension berechnet:

$$\text{Titer (TU/ml)} = \frac{\text{eingesetzte Zellen} \times (\% \text{ GFP - positive Zellen} \div 100)}{\text{Volumen Virussuspension (in ml)}}$$

3.4.9 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht die spezifische Detektion von Proteinen auf der Oberfläche, bzw. in inneren Kompartimenten oder Plasma von Zellen. Hierfür werden Zielprotein-spezifische Antikörper oder Seren in Kombination mit fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpern verwendet. Bei einer intrazellulären Detektion muss die Zellmembran zunächst mit Hilfe eines Detergenz permeabilisiert werden, um den Antikörpern Zugang zum Antigen zu verschaffen. Die fluoreszenzmarkierten Antikörper werden über eine UV-Lichtquelle im Fluoreszenzmikroskop angeregt, woraufhin sie Licht in einer farbstoffspezifischen Wellenlänge emittieren. Durch den Einsatz von auf den Farbstoff abgestimmten Filtern können interferierende Wellenlängen ausgeblendet werden.

Adhärenz wachsende Zellen wurden auf Deckgläschen (Roth) in einer 6-Well Platte (TPP) ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 70% kultiviert. Das Medium wurde entfernt, die Deckgläschen mit PBS gespült und mit 2% (v/v) Formaldehyd in PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nach drei zehnmütigen Waschschritten mit PBS wurden die Zellen gegebenenfalls mit einer 1%-igen (v/v) Tritonlösung (Triton X100, Roth) für 15

Minuten permeabilisiert. Nach der Permeabilisierung der Zellen folgten drei weitere Waschschrte. Unspezifische Bindungen wurden durch Inkubation mit einer Blockierungslösung (5% (w/v) Milchpulver (Sucofin) in PBS) für 1 Stunde bei 37°C und 95% Luftfeuchtigkeit (Brutschrank BBD 6220, Heraeus) abgesättigt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit dem entsprechend in Blockierungslösung verdünnten Primärantikörper (z.B. Ziegen Serum 16, Verdünnung siehe Tab. 2.6) für 60 Minuten im Brutschrank. Nach drei fünfminütigen Waschschrten mit PBS wurden die Zellen für 1 Stunde bei 37°C mit dem entsprechenden FITC-gekoppelten, Spezies-spezifischen Sekundärantikörper (DakoCytomation) in der vom Hersteller angegebenen Verdünnung in Blockierungslösung inkubiert. Im Anschluß an drei weitere fünfminütige Waschschrte mit PBS wurden die Deckgläschen aus den *wells* genommen, zusammen mit ProLong® Antifade Reagent (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers auf Objektträger gegeben (dabei Zellen nach unten), über Nacht getrocknet und anschließend im Dunkeln gelagert. Die Zellen konnten unter dem Fluoreszenzmikroskop (ECLIPSE E600, Nikon) oder dem CSLM510 LASER-SCANNING MICROSCOPE (Zeiss) betrachtet werden, dabei wurde das FITC bei 488 nm angeregt und dessen Emission bei 530 nm detektiert.

3.4.10 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (*Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS*®) ermöglicht es, die physikalischen und molekularen Eigenschaften einzelner Zellen in einem Flüssigkeitsstrom zu analysieren und zu sortieren. Zusätzlich zur Bestimmung von Zellgröße und Granularität des Zytoplasmas kann mit Hilfe der Durchflusszytometrie auch die Expression fluoreszierender Proteine wie z.B. GFP quantifiziert werden. Sobald diese Proteine durch einen Laserstrahl angeregt werden, emittieren sie Licht einer spezifischen Wellenlänge, welches mit *photomultipliern* verstärkt wird. Auf diese Weise ist es möglich unterschiedliche Fluoreszenzproteine oder Fluorochrome unabhängig von einander zu analysieren. Die Intensität des emittierten Lichts verhält sich proportional zur Menge des exprimierten fluoreszierenden Proteins, wodurch die Expressionsrate dieses Proteins einer einzelnen Zelle innerhalb gemischter Zellpopulationen gemessen werden kann. Des Weiteren ist es möglich, Zellen zuvor mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern, die sich gegen spezifische Oberflächenmoleküle richten, zu markieren. Nach einer solchen Markierung kann die Analyse oder auch die Sortierung nach Vorhandensein dieser Moleküle erfolgen.

Für die FACS-Analyse wurden 1×10^6 bis 5×10^6 Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und für 30 Minuten in 2,7% (v/v) Formaldehyd bei RT fixiert und erneut mit PBS gewaschen. Da sowohl humane HeLa-Zellen als auch porcine foetale Fibroblasten dazu neigen, Aggregate mit anderen Zellen zu bilden, wurde die Zellsuspension zur Gewinnung einer einzelligen Suspension mit Hilfe von PRE SEPARATION FILTERS (Miltenyi Biotech) nach Angaben des Herstellers filtriert. Die Fluoreszenz wurde am Zytometer FACS CALIBUR (Beckton Dickinson) gemessen. Die Auswertung der Durchflusszytometrie erfolgte mit Hilfe der Software CELLQUEST PRO (Beckton Dickinson).

Für das Sortieren der Zellen nach GFP-Expression wurden diese mit Hilfe der PRE SEPARATION FILTERS (Miltenyi Biotech) nach Angaben des Herstellers filtriert und direkt

eingesetzt. Das Sortieren erfolgte mit dem MOFLO HIGH-PERFORMANCE CELL SORTER (Dako) beim FACS-Service der Max Planck-Institutes für Infektionsbiologie (Berlin).

3.4.11 Erzeugung transgener Schweine

Die Generierung transgener Schweine wurde von Dr. Björn Petersen (Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Institut für Tierzucht, Mariensee) nach der Methode des Nukleus-Transfers (HOLKER et al., 2005) durchgeführt.

3.5 Immunologische Methoden

3.5.1 Immunisierung mit rekombinanten Proteinen

Zur Antikörpergewinnung wurden Versuchstiere (weibliche Wistar Ratten oder Ziegen) mit dem entsprechenden rekombinant hergestellten Antigen immunisiert. Unmittelbar vor der Immunisierung wurde das in PBS aufgenommene Antigen im Verhältnis 1:1 mit öligem (Adjuvans INCOMPLETE FREUND'S ADJUVANT, Pierce) vermischt und durch Suspendieren mit Hilfe einer Kanüle (\varnothing 0,6 mm, BD) in eine sahnige Konsistenz versetzt. Die Immunisierungen erfolgten durch intramuskuläre (i.m.) und subkutane (s.c.) Injektionen der Antigene. Die Mengen und die Applikationsorte der Injektionen sind in Tabelle 3.11 aufgeführt:

Tabelle 3.11: Applikationsschema für die Immunisierung von Ratten und Ziegen

Versuchstier	Menge Antigen	Volumen Antigen-Adjuvans-Gemisch	Injektionen
Wistar Ratte	150 μ g	1 ml	je 250 μ l i.m., in beide Hinterläufe 500 μ l s.c. in die Nackenfalte
Ziege	250 μ g	2 ml	je 1 ml i.m. in beide Hinterläufe

Drei Wochen nach der ersten Immunisierung erfolgte der erste *boost* mit dem gleichen Antigen, sechs Wochen später der zweite, jeweils nach dem gleichen Applikationsschema. Vor der ersten Immunisierung und drei Wochen nach jedem *boost* wurde den Tieren Blut entnommen (den Ziegen ca. 50 ml, den Ratten 1 ml) und dieses zur Serumgewinnung zunächst drei Stunden bei 4°C inkubiert. Das entstandene Koagulat wurde bei 4000 x g für 30 Minuten zentrifugiert (MEGAFUGE 1.0 R, Heraeus; CENTRIFUGE 5415D, Eppendorf), der Serumüberstand abgenommen, 30 min bei 56°C dekomplementiert und nach Zusatz von Penicillin/Streptomycin (Biochrom) bei 4°C gelagert.

3.5.2 DNA-Vakzinierung

Zur Induktion einer humoralen sowie einer zellulären Immunantwort wurden weibliche Wistar-Ratten mit an Goldpartikel präzipitierten DNA-Konstrukten immunisiert. Diese wurden mit Hilfe der HELIOS GENE GUN (BioRad) subkutan in die Bauchdecke der Tiere appliziert. Für jede aus vier Tieren bestehende Rattengruppe wurden zwölf Gold-DNA-beschichtete Patronen in das Magazin der gene gun geladen und jeder Ratte drei leicht

versetzte Schüsse bei 200 psi versetzt. Das Fell musste hierfür lokal rasiert werden. Während der Prozedur waren die Ratten mit Isofluran narkotisiert.

Vier Wochen nach der ersten Immunisierung erfolgte der erste Boost mit dem gleichen DNA-Konstrukt, weitere vier Wochen später der zweite. Zwei Wochen nach jedem Boost wurde den Tieren Blut entnommen. Die Serumgewinnung erfolgte wie oben beschrieben (3.5.1).

3.5.2 Neutralisationstest

Zum Nachweis der neutralisierenden Eigenschaften induzierter Seren wurde ein *in vitro* Neutralisationstest verwendet. Dieser *real-time* PCR-basierte Test beruht auf dem Nachweis der PERV-Provirusintegration nach einer 72-stündigen Inkubation uninfizierter 293-Zellen mit PERV-haltigen Zellkulturüberständen und den entsprechenden Immunsere.

Zu diesem Zweck wurden pro Well einer sterilen 96-Well-Flachbodenplatte (Nunc) 3×10^3 uninfizierte 293-Zellen in 100 μ l Medium ausgesät. Nach einer 24-stündigen Inkubation bei 37°C wurde das Medium vorsichtig abgenommen. In einer zweiten 96-Well-Platte wurden zuvor 100 μ l eines zuvor titrierten PERV-5^o-Virusstocks 1:2 verdünnt, mit 100 μ l vorverdünntem dekomplementiertem Serum (1:10 bzw. 1:20 Verdünnung im Well) gemischt und bei 37°C für 45 Minuten im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die mit den Seren vorinkubierten Überstände auf die Zellen pipettiert.

Nach 72 Stunden wurden die Überstände abgenommen und die Zellen lysiert. Die Zellyse erfolgte durch dreimaliges Einfrieren (-80°C) und Auftauen (56°C). Durch eine anschließende dreistündige Inkubation mit 100 μ l einer Proteinase K-Lösung (20 mg/ml, Invitrogen) bei 56°C wurden DNA-assoziierte Proteine enzymatisch abverdaut. Im Anschluß erfolgte eine 30-minütige Inaktivierung der Proteinase K bei 95°C. Das Zellysats wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert oder direkt als *template* für die *real-time* PCR zum Provirusnachweis eingesetzt. Alle Proben wurden dabei als Triplikate gemessen. Die Auswertung des Neutralisationstests erfolgte über die C_T -Werte. Der C_T -Wert einer Probe in Relation zur Kontrolle ermöglichte die Quantifizierung des Ausgangsmaterials. Die Messwerte der Kontrollseren (Seren einer mit Adjuvans oder Leervektor immunisierten Rattengruppe oder Präimmunsere) wurden mit einer 100%igen Infektion gleichgesetzt. So konnte über die folgende Formel der Grad der Provirusintegration in % berechnet werden:

$$I [\%] = E^{-\Delta CT} \times 100, \quad \text{mit } E = 2 \text{ und } \Delta CT = \text{Mittelwert } C_T \text{ Serum} - \text{Mittelwert } C_T \text{ Kontrollserum}$$

Die Normalisierung erfolgte über die GAPDH-Messwerte, indem die Differenz aus beiden C_T -Werten gebildet wurde ($C_{T_i} = C_{T_{\text{Virus}}} - C_{T_{\text{GAPDH}}}$). Wichen Messwerte um mehr als 1 C_T von dem Mittelwert aller GAPDH-Werte ab, so wurde der Messwert in der Berechnung der Provirusintegration nicht berücksichtigt.

Die Neutralisation ist der Provirusintegration bzw. der Infektion entgegengesetzt und wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Neutralisation } [\%] = 100 - I$$

Die Fehlerberechnung der Neutralisation wurde mit Hilfe der Gaußschen Fehlerfortpflanzung ermittelt.

$$\Delta N = \sqrt{\left(\frac{\delta N}{\delta \bar{c}_x} \cdot \Delta \bar{c}_x\right)^2 + \left(\frac{\delta N}{\delta \bar{c}_K} \cdot \Delta \bar{c}_K\right)^2}.$$

Die Einzelfehler von \bar{c}_x und \bar{c}_K resultierten dabei aus der Standardabweichung der Einzelmesswerte.