

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktosid, X-Gal	BTS-Biotech Trade Service GmbH, Sankt Leon-Rot
Agarose, peq Gold Universal Agarose	PEQLAB, Erlangen
Ampicillin	Bio-Rad, USA
Bacto-Hefeextrakt	Gibco Brl., Eggenstein
Bacto-Trypton	Gibco Brl., Eggenstein
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Bromphenolblau	Bromma, Schweden
Carboxymethylcellulose	BDH Limited Poole, England
Ciprofloxacin	PAA Laboratories, Cölbe
Diethylpyrocarbonat, DEPC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Dithiothreitol, DTT	Invitrogen, Karlsruhe
D-MEM-Medium	Gibco Brl., Eggenstein
2'-Deoxynucleosid-5'-triphosphat, dNTPs	Invitrogen, Karlsruhe
Earle's MEM-Medium	PAA Laboratories, Cölbe
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Gibco Brl., Eggenstein
Ethylendiamintetraacetat, EDTA	Merck KGaA, Darmstadt
Formaldehyd	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Fötales Kälberserum, FKS	PAA Laboratories, Cölbe
Glukose	Merck KGaA, Darmstadt
Glutamin	Biochrom AG, Berlin
Glycerin	Merck KGaA, Darmstadt
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid, IPTG	BTS-Biotech Trade Service GmbH, Sankt Leon-Rot
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
L-Glutamin	PAA Laboratories, Cölbe

Magnesiumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Molekulargewichtsstandard, GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	MBI Fermentas GmbH, Sankt Leon-Rot
Naphtol Blue Black	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Natriumacetat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumfluorid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Oligonukleotide	TIB MOLBIOL, Berlin
RNA-later-RNA-Stabilization-Reagent	Qiagen, Hilden
RNase und DNase freies Wasser	Fluka Chemikalien GmbH, Schweiz
Salzsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Trizma®Base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Tris-HCL	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories, Cölbe
Thymol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

---

## 2.2 Antikörper

---

Bird IgG (h & l) Antikörper, FITC konjugiert	Bethyl Laboratories Inc., USA
Anti-Tauben-IgG-Hyperimmunserum, aus Kaninchen	PD Dr. Christian Grund, Universität München
Goat anti-Horse IgG (h & l) Antikörper, FITC konjugiert	Bethyl Laboratories Inc., USA
Rabbit IgG-Antikörper, FITC konjugiert	dianova, Hamburg

---

## 2.3 Kits

---

RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAampViral RNA Kit	Qiagen GmbH, Hilden
PAXgene Blood RNA Kit	Qiagen GmbH, Hilden
PAXgene RNA Röhrchen	Qiagen GmbH, Hilden

TURBO DNA-free™	Ambion Inc., USA
Armored RNA® Technology	Ambion Inc., USA
TaqMan Universal Master Mix	ABI, Weiterstadt
Jetquick Gel Extraction Spin Kit	Genomed, Löhne
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Z-Competent <i>E.coli</i> Transformation Kit	Zymo Research, USA
NucleoSpin Plasmid Kit	Machery-Nagel, Düren
Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Big Dye Terminator Cycle Sequencing ready Reaction Kit	ABI, Weiterstadt
<i>West-Nil-Virus</i> ELISA, IgG	Focus Technologies, USA
<i>West-Nil-Virus</i> ELISA, IgG	EUROIMMUN AG, Lübeck
<i>West-Nil-Virus</i> ELISA, IgG	Panbio Limited, Australia
<i>West-Nil-Virus</i> Indirekter Immunfluoreszenz-Test, IgG	EUROIMMUN AG, Lübeck
<i>Gelbfiebervirus</i> Indirekter Immunfluoreszenz-Test, IgG	EUROIMMUN AG, Lübeck
<i>Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus</i> Indirekter Immunfluoreszenz-Test, IgG	EUROIMMUN AG, Lübeck
<i>Denguevirus</i> Indirekter Immunfluoreszenz-Test, IgG	EUROIMMUN AG, Lübeck

---

## 2.4 Nährmedien

---

<b>Luria-Bertani (LB)-Medium</b>	Zusammensetzung
	10 g/l Bacto-Trypton
	5 g/l Bacto-Hefeextrakt
	10 g/l Natriumchlorid (NaCl)
	pH-Wert: 7,0 ± 0,2

---



---

<b>Luria-Bertani (LB)-Agar</b>	Zusammensetzung
	10 g/l Bacto-Trypton
	5 g/l Bacto-Hefeextrakt
	10 g/l Natriumchlorid (NaCl)

---

15 g Agar

pH-Wert: 7,0 ± 0,2

---



---

**SOB-Medium**

Zusammensetzung

---

20 g/l Bacto-Trypton

5 g/l Bacto-Hefeextrakt

0,5 g/l Natriumchlorid (NaCl)

0,186 g/l Kaliumchlorid (KCl)

pH-Wert: 7,0 ± 0,2

---

**2.5 Puffer und Lösungen**

**2.5.1 Anticoagulant Preservation Solution, APS-Puffer**

---

**APS-Puffer**

Zusammensetzung

---

100g/l EDTA 10 %, C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>

10 g/l Natriumfluorid 1 %, NaF

ad destilliertes Wasser, H<sub>2</sub>O dest.

mit Thymol, C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O sättigen

pH-Wert: 8,0

---

**2.5.2 PCR-Puffer**

---

**2x TaqMan Master Mix**

Applied Biosystems, Darmstadt

**NH<sub>4</sub>-10x-Puffer**

Invitek GmbH, Berlin

---

**2.5.3 Agarose-Gelelektrophorese**

---

**TAE-Puffer (50x)**

Zusammensetzung

---

242 g/l Tris-Base (Trizma), C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>

57,1 ml/l Essigsäure, C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>

100 ml/l EDTA, C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, 0,5 M

pH-Wert: 8

---

<b>6x-Ladepuffer</b>	Zusammensetzung
	10 mM Tris-HCl, C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> ·HCL
	2 mM EDTA, C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>
	15 % Glycerin, C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>
	pH-Wert: 7,5
	0,1 % Bromphenolblau

### 2.5.4 Zellkulturlösungen und Medien

<b>Trypsinlösungsmittel, Diluent</b>	Zusammensetzung
	8 g/l Natriumchlorid, NaCl
	0,4 g/l Kaliumchlorid, KCl
	0,06 g/l Kaliumhydrogenphosphat, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	0,06 g/l Natriumhydrogenphosphat, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1 g/l Glukose, C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>
	0,375 g/l Natriumhydrogencarbonat, NaHCO <sub>3</sub>
	pH-Wert: 7,0
	+ 0,2 % EDTA, C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>

<b>Carboxymethylcellulose-Lösung (CMC)</b>	Zusammensetzung
	3,2 g Carboxymethylcellulose, autoklaviert
	200 ml Zellkulturmedium

<b>Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, PBS-Puffer „ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>“</b>	Zusammensetzung
	80 g/l Natriumchlorid, NaCl
	2 g/l Kaliumchlorid, KCl
	26,8 g/l Natriumhydrogenphosphat, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	2,4 g/l Kaliumhydrogenphosphat, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	pH-Wert: 7,4

<b>Naphtalenblack</b>	Zusammensetzung
	1 g Naphtol Blue Black
	13,6 g Natriumacetat, C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub>
	60 ml Essigsäure, C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>
	ad 1 l destilliertes Wadder, H <sub>2</sub> O dest.

<b>Leibowitz-Medium, L15-Medium</b>	Invitrogen, Karlsruhe
Zusatz von:	5 % Fötale Kälberserum (FKS)
	1 % Glutamin

<b>Dulbeccos Modified Eagles Medium, D-MEM-Medium</b>	Invitrogen, Karlsruhe
Zusatz von:	5 % Fötale Kälberserum (FKS)
	1 % Glutamin

### 2.5.5 Desinfektionsmittel

Buraton	Schülke& Mayr, Norderstedt
Sterilium Virugard	Bode Chemie, Hamburg
Lysoform	Lysoform Dr. Hans Rosemann AG, Berlin

### 2.6 Virusstämme

Virus-Isolate	Accessionnummer (ATCC-Nr.)	Herkunft
<i>West-Nil-Virus</i> (WNV) Uganda B956	AY532665	Prof. G. Wengler, Justus-Liebig-Universität
WNV goshawk-Hungary/04	DQ116961	Prof. N. Nowotny, Universität für Veterinärmedizin, Wien
WNV France PaAn001	AY268132	Prof. H. Zeller, Institute Pasteur, Lyon
WNV New York	AF196835	Dr. T. Kreil, Baxter AG
WNV Israel	nicht veröffentlicht	Dr. H. Bin, Sheba Medical Center, Israel

WNV Isolat Rabensburg 97-103	AY765264	Prof. N. Nowotny, Universität für Veterinärmedizin, Wien
<i>Kunjin-Virus</i>	nicht veröffentlicht	Prof. H. Zeller, Institute Pasteur, Lyon
<i>Usutu-Virus</i> Stamm Vienna 2001 from Austria	AY453411	Dr. M. Pfeffer, Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr
<i>Japan-Enzephalitis-Virus</i>	ATCC SA14-14-2	ATCC
<i>St.-Louis-Enzephalitis-Virus</i>	ATCC VR 1265	ATCC
<i>Denguevirus</i> , Typ 1	ATCC VR-344	ATCC
<i>Denguevirus</i> , Typ 2	ATCC VR-345	ATCC
<i>Denguevirus</i> , Typ 3	ATCC VR1256	ATCC
<i>Denguevirus</i> , Typ 4	ATCC VR-1257	ATCC
<i>Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus</i> , Stamm K23	AF091010	Stammsammlung RKI
<i>Gelbfieberevirus</i> , Stamm ASIBI	AY640589	Stammsammlung RKI
<i>Gelbfieberevirus</i> , Stamm 17D	X03700	Stammsammlung RKI

## 2.7 Technische Geräte und sonstige Laborgeräte

### Autoklaven:

Automat 21/2	Webeco, Bad Schwartau
Varioklav®	H und P Labortechnik, Oberschleißheim

### Thermozykler:

ABI Prism-7700-Sequence Detector	ABI, Weiterstadt
ABI Prism-7900-Sequence Detector	ABI, Weiterstadt
Thermozykler Genamp® 2400	PerkinElmer, USA
Thermozykler Genamp® 9700	PerkinElmer, USA
ABI Prism® 3100 Genetic Analyser	Applied Biosystems, Darmstadt
Elektrophoresekammer, Horizon 58	Gibco Brl., Eggenstein
ELISA-Reader	TECAN, Berlin
Videodokumentationsgerät	PEQLAB, Erlangen

## Zentrifugen:

Tischzentrifuge, 5417 R Eppendorf AG, Hamburg

Laborzentrifuge, Omnifuge 2.0 RS Heraeus, Hanau

Laborzentrifuge, Minifuge RF Heraeus, Hanau

Photometer Beckman Coulter, Krefeld

## Mikroskope:

Konfokales Laserscanning Mikroskop, clSM510 Carl Zeiss GmbH, Jena

Lichtmikroskop, Axiovert 25 Carl Zeiss GmbH, Jena

Fluoreszenzmikroskop, Axiokop 20 Carl Zeiss GmbH, Jena

Neubauer-Zählkammer Carl Roth GmbH, Karlsruhe

## Kühlschränke:

Gefrierschränke: -20 °C Bosch, Berlin; Siemens, Berlin

Gefrierschränke: -70 °C Heraeus, Hanau; Sanyo (Cotech), Berlin

Magnetrührer/Heizplatte, MR 2002 Heidolph Instruments, Schwabach

Wasserbad Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach

Vortexer, Reax 2000 Heidolph Instruments, Schwabach

Pipetten (10 µl bis 1000 µl) Becton Dickinson Labware, USA

Eppendorf AG, Hamburg

Pipettierhilfe, Accujet® Brand, Wertheim

## Brutschränke:

Brutschrank für Zellkultur, BB6220 Heraeus, Hanau

Brutschrank für Bakterienkultur, B6030 Heraeus, Hanau

Glasware Brand GmbH &amp; CO KG, Wertheim

Stickstofflagerungstank Union Carbide, USA

Polytron Homogenisator, PT 1300D Kematica AG, Schweiz

Sicherheitswerkbank BioGARD Hood The Baker Company, USA

---

## 2.8 Verbrauchsmaterialien

---

24-Well-Platten für Zellkultur Nunc, Wiesbaden

48-Well-Platten für Zellkultur Nunc, Wiesbaden

96-Well-Platten für Zellkultur:  
(mit flachem Boden) Nunc, Wiesbaden



(mit v-Boden)	Greiner, Nürtingen
96-Well-Plattten für PCR, Thermo-Fast 96, Non skirted	ABgene, UK
Einmal-Injektions-Kanülen, Dünnwand (Größe 2, 12, 14, 17, 20)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Einmalspritzen (10 ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Einwegpipetten (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Nunc, Wiesbaden
Einwegskalpelle	B. Braun Aesculap, Tuttingen
Entsorgungsbeutel	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Hautdesinfektionsspray, 250 ml	Heiland GmbH & Co KG, Hamburg
Kryogefäße (1,8 ml mit Innengewinde)	Nunc, Wiesbaden
Mikro-Haematokrit-Kapillarröhrchen, heparinisiert	Heiland GmbH & Co KG, Hamburg
Monovette EDTA/KE (1,2 ml, 9 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Multifly® Set (0,6 x 19 mm)	Sarstedt, Nümbrecht
MYJECTOR® U-40 Insulin, 1 ml	Terumo Europe, Belgien
Nitril-Handschuhe rotiprotect®	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Parafilm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Pipettenspitzen aerosolgeschützt (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	ART Molekular BioProducts, München
Pipettenspitzen ohne Aerosolschutz (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Probengefäß zur Serumgewinnung (1,3 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Qiagen Shredder Spin Säulen	Qiagen GmbH, Hilden
Reaktionsgefäße:	
0,2 ml Thermo-Tube	ABgene, UK
0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
15 ml, 50 ml	Nunc, Wiesbaden
Sterilfilter (0,22 µm, 45 µm)	Millipore, USA
vorgestanztes Filterpapier	Whatman® Schleicher & Schuell, BioScience GmbH, Dassel
X5151 Heat Seal Film	ABgene, UK
Zellkulturflaschen:	
mit Filterdeckel (25 cm <sup>3</sup> , 75 cm <sup>3</sup> , 175 cm <sup>3</sup> )	Nunc, Wiesbaden
mit geschlossenem Deckel (25 cm <sup>3</sup> , 75 cm <sup>3</sup> , 175 cm <sup>3</sup> )	Nunc, Wiesbaden

Zellschaber (23 cm, 32 cm)

Nunc, Wiesbaden

## 2.9 Software, Datenbanken

DNASTAR Lasergene 6	DNASTAR Inc., Madison, USA
Easy Win	Herolab GmbH, Wiesloch
Primer Express™	Applied Biosystems, Darmstadt
Prism 3.02	GraphPad Software
SPSS, Version 13.0	SPSS Inc. Chicago, USA
SPSS SigmaPlot	SPSS Inc. Chicago, USA
Zeiss LSM Image Browser	Carl Zeiss GmbH, Jena
NCBI, Datenbank	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>

## 2.10 Enzyme und Nukleinsäuren

Carrier-RNA	Qiagen GmbH, Hilden
Lambda-DNA	Fermentas, Leon-Rot
pEMBL-Vektor	Dr. Heinz Ellerbrok, Robert Koch-Institut
Platinum Taq-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Superscript™ RNase H <sup>-</sup> Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
transfer-RNA, t-RNA	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase, <i>Thermus aquaticus</i>	Invitex, Berlin

## 2.11 Oligonukleotidprimer

Name des Primers	Bezeichnung der Genregion, Basensequenz	Acessionnr.	Basen-Lokalisation
	<b>WNV 5' UTR/Capsid Protein (ProC)</b>	M12294	
ProC F1	CCT gTg TgA gCT gAC AAA CTT AgT	S	10-33
ProC F	ACA ACA ATTA ACA CAg TgC gAg C	S	51-73
ProC TM	6FAM-CCT ggT TTC TTA gAC ATC gAg ATC T XT CgT gC p	A	83-113
ProC R	GCg TTT Tag CAT ATT gAC AgC C	A	132-153

		MATERIAL UND METHODEN	
	<b>WNV NS3 Genotyp I</b>	AF202541	
BF3 F	gCA CTg AgA ggA CTg CCC AT	S	5314-5333
BF3 341T	6FAM-TAC CAg ACA TCC gCA gTg CCC AgA XT p	S	5338-5361
BF3R	Tgg gTg Agg gTA gCA TgA CA	A	5414-5395
	<b>WNV NS3 Genotyp II</b>	m12294	
NS3-I-F	gCC CTg AgA ggA CTT CCC AT	S	5302-5321
NS3 TM	6FAM-CAA CgA TCT CAT TTC CAC TgT gCT CTC TgT gC XT p	A	5343-5374
BF3R	Tgg gTg Agg gTA gCA TgA CA	A	AF202541 5414-5395
	<b>WNV NS5 Genotyp I</b>	AF202541	
DF3-F	gCT CCg CTg TCC CTg TgA	S	9992-10009
DF3 107 T	6FAM-Tgg gTC CCT ACC ggA AgA ACC ACg T XT p	S	10012-10035
DF3-R	CAC TCT CCT CCT gCA Tgg ATg	A	10061-10041
	<b>WNV Protein E</b>		
WN 132	gAA AAC ATC AAg TAT gAg g	S	AF418554 1-19
WN 240	gAg gTT CTT CAA ACT CCA T	A	322-340
WNV E F	gAG AAT ATC AAg TAC gAA gT	S	AF404756 1363-1382
WNV E R	ggT TCC TCA AAC TCC A	A	1685-1700
	<b>Usutu-Virus NS5</b>	AY453411	
Usutu-331F	CTg ACC TAC AAA CAC AAG gTg g	S	9400-9421
Usutu-375F	AgA Tgg gAA gAC CgT CAT gg	S	9444-9463
Usutu-475R	ggA Cgg CAA TgT Tgg TgA AT	A	9525-9544
Usutu-531R	ACT TTC CAg ATg TTC CTg CC	A	9581-9600
Usutu-TM	6FAM-TTC CCg AgA AgA TCA gAg Agg AAg Tgg ACA g T XT p	S	9501-9472
	<b>SMRV Protein E</b>	M23385	
SMRV-7658R	CTA CTT Cgg CTA ggg AAT CTA gTT g	A	7634-7658
SMRV-7489F	CCT gCT AgT Agg ATT ggg TgT CTC T	S	7489-7513
SMRV-TM	6FAM-TAA CgA CgT CCA AgC CTT gTC Tag CAC CA XT p	S	7588-7617

<b>Cytochrom B</b>		
258 s	CCA TCC AAC ATC TCA gCA TgA TgA AA	S
258 as	gCC CCT CAg AAT gAT ATT TgT CCT CA	A
<b><i>Mycoplasma columbinasale</i>, 16 S rRNA</b>		
GPO-3	Ggg AgC AAA CAg gAT Tag ATA CCC T	S
MGSO	TgC ACC ATC TgtCAC TCT gTT AAC CTC	A
<b>Primer für Kolonien-PCR, Sequenzierung</b>		
T7	gTA ATA CgA CTC ACT ATA ggg Cg	
M13	CAG gAA ACA gCT ATg AC	

## 2.12 Eukaryotische Zelllinien

### Vero E6-Zellen

Bei dieser adhärenen Zelllinie handelt es sich um eine Nieren-Fibroblasten-Zelllinie der Grünen Meerkatze, *Cercopithecus aethiops*. Die Zellen stammten aus einem gesunden adulten Tier und eignen sich für die Infektion mit verschiedenen Viren wie z.B. Polio- Rubella- Herpes- und Arboviren.

### Hep2-Zellen

Die adhärenente Zelllinie stammte ursprünglich aus einem Larynx-Karzinom eines kaukasischen Manns, 56 Jahre alt. Die Zellen sind epithel-ähnlich und sind geeignet für die Anzucht folgender Viren: Adenoviren, Polioviren, Herpesviren und *Respiratorisches Syncytial-Virus*.

### C6/36-Zellen

Diese adhärenente Zelllinie hat ihren Ursprung in einem Darmepithelzellen-Klon von Larven der Stechmückenart *Aedes albopictus* und eignet sich für die Anzucht von Flaviviren.

### PS-Zellen

Diese adhärenenten epithel-ähnlichen Zellen stammten aus embryonalen Schweinenieren. Die Zellen eignen sich vor allem für die Infektion von Arboviren, Adenoviren und Reoviren.

**Tabelle 6:** Eigenschaften und Herkunft von eukaryotischen Zellen

Zelllinie	Wachstumseigenschaften	Herkunft
C6/36	adhärente Zellen	CDC
Hep 2	adhärente Zellen	Robert Koch-Institut, Dr. Voß
PS	adhärente Zellen	WHO
Vero E6	adhärente Zellen	ATCC, CRL-1586

### 2.13 Untersuchungsmaterial

Um die Prävalenz und Inzidenz von WNV in Deutschland zu untersuchen, wurde verschiedenartiges Probenmaterial (Blutproben, Cerebrospinalflüssigkeitsproben und Gewebeproben) untersucht. In die Studie wurde retrospektiv EDTA-Blut und Liquor von 112 humanen Patienten mit neurologischen Symptomen unklarer Genese, 51 RNA-Proben von AFP-Patienten und EDTA-Blutproben von 137 „gesunden“ Probanden eingeschlossen. Weiterhin wurden Proben von Personen mit WNV-Verdacht aus Rumänien untersucht. Neben den humanen Proben wurden 172 Liquor und Serumproben von ZNS-erkrankten Pferden untersucht und von 28 gesunden Pferden EDTA-Blut gesammelt. 3427 Blutproben (EDTA-Blut und Serum) sowie Gewebeproben von 87 verschiedenen Vogelarten wurden zusammengetragen. Für die Sammlung der Blutproben an lebenden Wildvögeln wurde in den jeweiligen Bundesländern ein Antrag auf Ausnahmegenehmigung nach BNatSchG § 43 Abs. 8 Nr. 3 zur Blutabnahmen bei Wildvögeln gestellt sowie eine Tierversuchsanzeige nach TSchG § 8 Abs. 7 Satz 2a. Für Vorversuche wurde EDTA-Blut von 2 spezifisch pathogenfreien Hühnern (SPF-Hühner) entnommen und gepoolt. Die Blutentnahme erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. M. Lierz und N. Hagen an der Freien Universität Berlin.

### 2.14 Probengewinnung

#### 2.14.1 Blutentnahme bei Vögeln

Die Blutabnahme bei Vögeln erfolgte aus der Flügelvene (*Vena ulnaris*). Dazu wurde bei kleinen Singvögeln (Amselgröße und kleiner) der Flügel abgespreizt und mit Desinfektionsspray besprüht. Der Flügel wurde mit der Hand fixiert, die Federn beiseite geschoben und mit der Kanüle einer MYJECTOR U-40 Insulin-Spritze angeritzt. Das

ausgetretene Blut wurde mit einem Mikro-Haematokrit-Kapillarröhrchen aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit bzw. ohne APS-Puffer aufgefangen. Es wurden Blutvolumen von 1 µl bis ca. 200 µl entnommen. Krähenvögeln und Weißstörchen wurde eine Einmal-Injektions-Kanüle entsprechender Größe in die Vene eingeführt und das Blut direkt aus der Kanüle in ein Probengefäß zur Serumgewinnung oder in eine EDTA/KE-Monovette überführt. Dabei wurde den Tieren ein Blutvolumen von 10 µl bis 1,5 ml entnommen. Die Proben wurden bis zum Transport ins Labor kühl gehalten und im Labor zentrifugiert. Teilweise wurden Vollblutproben gesammelt, bei -20 °C tiefgekühlt ins Labor geliefert und zu einem späteren Zeitpunkt zentrifugiert. Vollblutproben ohne APS-Puffer wurden 1:5 in PBS „ohne“ verdünnt, zentrifugiert und der Überstand für die Versuche verwendet.

### **2.14.2 Sektion von Vogelkadavern**

Im Rahmen von Abschussprogrammen für Krähenvögel in Baden-Württemberg wurden Vogelkadaver durch die Vogelwarte Radolfzell bereitgestellt, bei -20 °C eingefroren und für die Untersuchungen gelagert. Die Kadaver wurden im Labor unter dem Abzug aufgetaut. Restblut sowie Material aus dem Herz und Gehirn wurden aus dem Kadaver entnommen. Ein 1 cm x 1 cm großes Stück Gewebe wurde in ein Aliquot mit *RNAlater*<sup>TM</sup>-RNA-Stabilization-Reagenz gegeben und bis zur Weiterverwendung bei -70 °C eingefroren.

## **2.15 Isolation von Nukleinsäuren, RNA-Extraktion**

### **Vorsichtsmaßnahmen beim Arbeiten mit RNA**

Durch die chemische Instabilität von RNA und durch ubiquitär vorkommende RNasen muss die RNA-Extraktion an speziellen RNA-Arbeitsplätzen durchgeführt werden. Dazu wurden eigene „RNase-freie“ Verbrauchsmaterialien und Lösungen, die mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O oder DEPC-H<sub>2</sub>O angesetzt wurden, eingesetzt. Die isolierte RNA wurde bei -70 °C gelagert.

### **2.15.1 Extraktion der Gesamt-RNA aus Vollblut (PAXgene)**

Es wurden Vollblutproben von Pferden in PAXgene-Röhrchen gesammelt. Das PAXgene Prinzip ermöglicht es, die intrazelluläre RNA im Vollblut über mehrere Tage bei 4 °C zu

stabilisieren. Dazu wurde Blut mit PAXgene-Vacutainern abgenommen und RNA entsprechend den Hersteller-Angaben (Herstellerprotokolls des „PAXgene Blood RNA Kit“) aufgearbeitet. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -70 °C.

### **2.15.2 Extraktion der Gesamt-RNA aus Zellkulturüberständen**

Zellfreie Virusüberstände wurden mittels des Protokolls „RNeasy Mini Protocol for RNA Cleanup“ (RNeasy® Mini Kit) aufgearbeitet. Dafür wurden 100 µl Virusüberstand als Ausgangsvolumen eingesetzt. Die RNA wurde in 60 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O mit t-RNA als Träger-RNA (100 ng/µl) eluiert. Die RNA wurde bis zur Weiterverwendung bei -70 °C gelagert.

### **2.15.3 Extraktion der Gesamt-RNA aus EDTA-Vollblut**

EDTA-Vollblut von Vogelproben wurde zunächst 10 min bei 1500 rpm zentrifugiert und der Buffycoat (Schicht aus Leukozyten und Thrombozyten) sowie der Überstand abgenommen. 100 µl bzw. 200 µl Plasma wurden danach bei 4 °C für 90 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bis zu weiteren Verwendung bei -70 °C eingefroren, während das Pellet entsprechend den Angaben des Herstellers extrahiert wurde. Dazu wurde das Pellet in 350 µl RLT-Puffer mit β-Mercaptoethanol aufgenommen und nach dem „RNeasy Mini Protocol for Isolation of Total RNA from Animal Cells“ (RNeasy® Mini Kit) extrahiert. Die Elution erfolgte durch Zugabe von 60 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O mit t-RNA als Träger (100 ng/µl). Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C eingefroren.

### **2.15.4 Extraktion der Gesamt-RNA aus Cerebrospinalflüssigkeit**

Aus 200 µl Cerebrospinalflüssigkeit wurde die Gesamt-RNA extrahiert. Der Liquor wurde entsprechend dem Protokoll für „RNeasy Mini Protocol for Isolation of Total RNA from Animal Cells“ (RNeasy® Mini Kit) behandelt. Eluiert wurde die RNA in 60 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O mit t-RNA (100 ng/µl). Die RNA wurde bei -70 °C gelagert.

### 2.15.5 Extraktion der Gesamt-RNA aus Gewebe

Gewebe in *RNAlater*<sup>TM</sup>-RNA-Stabilization-Reagenz wurde mit einem Rotor-Stator-Homogenisator homogenisiert und die RNA nach dem „Protokoll RNeasy Mini Protocol for Isolation of Total RNA from Animal Tissues“ aufgearbeitet. Das Gewebe wurde zunächst durch eine Qiagen-Shredder-Säule zentrifugiert, um Zellreste zu entfernen. Die Elution erfolgte durch Zugabe von 60 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O mit t-RNA (100 ng/µl). Die RNA wurde bis zur Verwendung bei -70 °C eingefroren.

### 2.15.6 Extraktion der Gesamt-RNA aus getropftem getrockneten Blut

Vorgestanztes Whatman-Filterpapier wurde für die Asservierung von Blut verwendet. Die gestanzten Discs (d = 2 cm) wurden mit Vollblut betropft und getrocknet. Ein Disc mit Blut wurde mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O beträufelt (Wasservolumen identisch zum Blutvolumen) und das ausgestanzte Filterstück in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. 560 µl AVL Puffer mit carrier-RNA wurden dem Filter zugesetzt und das Reaktionsgefäß gevortext. Dann wurden 560 µl Ethanol 100 % (RNase-frei) dazu gegeben und gevortext. Im nächsten Schritt wurden 630 µl der Suspension auf die Säule gegeben und entsprechend dem Protokoll „QIAamp Viral RNA Mini Spin Protocol“ (QIAampViral RNA Kit) zentrifugiert. Die restliche Suspension wurde zentrifugiert und der Filterdisc ebenfalls auf die Säule gegeben und bis zur Elution mitgeführt. Die restlichen Schritte wurden entsprechend dem Protokoll ausgeführt. Eluiert wurde die RNA mit 140 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O. Die Langzeitlagerung erfolgte bei -70 °C.

### 2.15.7 Ethanolfällung von RNA

Die Ethanolfällung ist eine gebräuchliche Methode zur Aufkonzentrierung von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen. 140 µl RNA-Lösung wurden mit 14 µl Natriumacetat und 350 µl Ethanol (100 %, RNase-frei) versetzt, durchmischt und über Nacht bei -70 °C eingefroren. Danach wurde die Suspension für 30 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen und mit 1 ml Ethanol (70 %, RNase-frei) versetzt. Ein weiterer Zentrifugationsschritt von 15 Minuten bei 14.000 rpm folgte und der gesamte Überstand wurde



abgenommen. Das Pellet wurde in 40 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O aufgenommen und bei -70 °C eingefroren.

### **2.15.8 Photometrische Konzentrationsbestimmung**

Zur Quantifizierung von Nukleinsäuren wurde eine photometrische Konzentrationsbestimmung durchgeführt. Da das Extinktionsmaximum von Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm liegt, entspricht der Wert der optischen Dichte der Absorption einer Konzentration von 50 µg doppelsträngiger DNA, 33 µg einzelsträngiger DNA bzw. 40 µg einzelsträngiger RNA. Der Wert der optischen Dichte (OD) für DNA und RNA sollte zwischen 0,1 und 1,0 liegen, um eine optimale Messung zu erzielen. Reine DNA hat einen OD-Quotienten von  $A_{260}/A_{280} \geq 1,8$ , während reine RNA einen Quotienten von  $A_{260}/A_{280} \geq 2,0$  aufweist. Liegt der Wert  $< 1,8$ , so liegt eine Kontamination der DNA mit Proteinen oder anderen aromatischen Substanzen vor. Ein Wert  $> 2$  weist auf Verunreinigungen von RNA hin. Die zu quantifizierende DNA wurde 1:50 in H<sub>2</sub>O oder Elutionspuffern verdünnt und photometrisch die optische Dichte bestimmt.

## **2.16 Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCR)**

### **2.16.1 Reverse-Transkriptase (RT)-PCR**

Um virale RNA oder mRNA in einer PCR zu vervielfältigen, wird die RNA in einer Reversen-Transkriptase-Reaktion (RT-Reaktion) durch das Enzym Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Für die cDNA-Synthese werden verschiedene Oligonukleotidprimer eingesetzt, die für die Spezifität und die Länge der cDNA verantwortlich sind. Die mRNA weist einen Cap-Struktur am 3'-Ende auf, die charakterisiert ist durch die posttranskriptionale Polyadenylierung, so dass OligodT-Primer eingesetzt werden können, um möglichst große cDNA-Fragmente vom 3'-Ende in Richtung 5'-Ende zu produzieren. Random-Hexamernukleotide (Hex-6) verwendet man zur Synthese von kurzen cDNAs. Die dritte Variante ist die Verwendung von spezifischen Primern, um gezielte Bereiche der RNA in cDNA umzuschreiben. Nach der RT-Reaktion wird die cDNA in der PCR mit spezifischen Primern vervielfältigt. Die RT-PCR wurde in der vorliegenden Studie als Zwei-Schritt-PCR

ausgeführt, so dass sowohl die cDNA-Synthese als auch die PCR unter optimierten Bedingungen stattfinden konnten.

Die cDNA-Synthese wurde in einem Endvolumen von 20 µl bzw. 30 µl durchgeführt. Für die RT-Reaktion wurden Hex-6, OligodT und spezifische Primer verwendet. Die RNA wurde zunächst mit den Primern bei 64 °C inkubiert, um die Sekundärstrukturen zu lösen. Im nächsten Schritt erfolgte die eigentliche RT-Reaktion, bei der die Synthese je nach Primer bei 37 °C bzw. 42 °C stattfand (Hex-6 und OligodT: 37 °C; spezifische Primer: 42 °C). Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20 °C.

#### RT-Mix

Reagenzien	20 µl Volumen
5x First-Strand Puffer	4 µl
DTT (0,1 M)	2 µl
dNTPs (jeweils 25 mM)	0,4 µl
Primer (10 µM Hex-6; 10 µM spezifischer Primer; 500 ng/µl für OligodT)	1 µl
Superscript I	1 µl
RNA	11,6 µl

#### RT-Profil

Temperatur	Zeit
Lösen der Sekundärstrukturen von RNA und Primern	
65 °C	5 Min
4 °C	5 Min
Zugabe der Reversen Transkriptase und des Mixes aus DTT, Puffer und dNTPs	
37 °C für Hex-6 bzw. OligodT	50 Min
42 °C für spezifischer Primer	50 Min
Denaturierung	
72 °C	15 Min
Abkühlung	
4 °C	∞

### 2.16.2 Polymerase-Ketten-Reaktion

Zur Vervielfältung von DNA-Sequenzen durch Polymerasen wurde die Technik der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) verwendet. Zur Amplifikation der DNA setzt man die Polymerase I von *Thermus aquaticus* ein, die hitzestabil ist. Die PCR verläuft in mehreren Schritten. Zunächst wird die DNA bei 94 °C - 96 °C denaturiert, damit sich der DNA-Doppelstrang in seine Einzelstränge aufspaltet. Im darauf folgenden Annealing-Schritt binden die Primer komplementär in den ausgewählten Zielsequenzen an die Einzelstränge, wobei die Annealingtemperatur abhängig von der Schmelztemperatur der Primern ist. Anschließend erfolgt die DNA-Synthese (Elongation) bei 72 °C - 74 °C bei der zu den Einzelsträngen ausgehend von den Primern ein komplementärer DNA-Strang gebildet wird. Die neue entstandenen Doppelstränge werden durch Denaturierung wieder in Einzelstränge aufgespalten und dienen als neue Matrize (Template) für die nächste Annealing- und Elongationsphase. Durch die Wiederholung der Schritte, meist  $n = 25 - 45$  Zyklen kann die DNA um ein Vielfaches amplifiziert werden:  $2^n$  Zyklen. Abschließend wird die DNA für weitere 5 - 15 Minuten bei 72 °C inkubiert, um die Elongation vollständig abzuschließen.

#### PCR Mix

Reagenzien	Volumen
10x-NH <sub>4</sub> -Puffer	5 µl
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	2 µl
dNTPs (2,5 mM)	4 µl
Sens Primer (10 µM)	1,5 µl
Revers Primer (10 µM)	1,5 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl
Template-DNA	1 - 10 µl
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl

## PCR Profil

Temperatur	Zeit	Zyklen
94 °C	2 - 4 min	
94 °C	20 - 30 Sek	
50 - 65 °C *	30 Sek	30 - 45
72 °C	45 Sek	
72 °C	10-15 Min	
4 °C	∞	

\*: die Annealingtemperatur wurde entsprechend der Schmelztemperaturen der Primer gewählt

### 2.16.3 Gelelektrophorese zur Identifizierung von PCR-Produkten

Zur Kontrolle einer erfolgreichen DNA-Amplifizierung mit der gewünschten Basenpaargröße kann diese mit der analytischen Methode der Gelelektrophorese untersucht werden. Das PCR-Produkt wird in einem Agarosegel entsprechend seiner Größe aufgetrennt. Dabei spielt die Porengröße der Agarose eine große Rolle, da dadurch die Beweglichkeit der Nukleinsäuren beeinflusst wird und eine Größenauftrennung möglich wird. Ferner lagert sich das Ethidiumbromid an die DNA an und fluoresziert bei einer Wellenlänge von 302 nm, so dass das Gel unter UV-Licht ausgewertet werden kann.

2 µl des PCR-Produktes wurden mit 5 µl des 6x-Ladepuffers gemischt und in die Taschen eines Agarosegels pipettiert. Je nach erwarteter Fragmentgröße wurde die Konzentration der Agarose eingestellt (1 % - 2 %). Als Kontrolle wurde ein Molekulargewichtsstandard mitgeführt. Die Amplifikate wurden in einer ionischen Pufferlösung aus 1x TAE-Puffer mit Hilfe einer Spannungsquelle bei 90 V aufgetrennt. Die Dokumentation der Auftrennung erfolgte durch Fluoreszenzanregung des Ethidiumbromids im UV-Licht. Die analytischen Gele wurden mit einer Videokamera fotografiert und mit Hilfe von Software (Herolab) ausgewertet. Bei präparativen Gelen wurde die gewünschte DNA-Bande ausgeschnitten und gereinigt.

#### 2.16.4 Real-Time-PCR: TaqMan-PCR

Die TaqMan-PCR ist eine quantitative PCR. Im Gegensatz zu einer konventionellen PCR wird bei der TaqMan-PCR eine zusätzliche Hybridisierungssonde, die mit Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, verwendet. Die Sonde enthält am 5'-Ende einen Reporterfarbstoff (Fluoreszin-Derivat), am 3'-Ende einen Quencherfarbstoff (Rhodaminderivat) und wird durch einen Phosphatrest am 3'-Ende blockiert (Lee et al. 1993). Durch den FRET-Transfer (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer) bei einer Wellenlänge von 488 nm wird das Fluoreszenzsignal des Reporters durch die räumliche Nähe des Quenchers absorbiert. Während der PCR hybridisiert die Sonde mit den Primern an den Matrizenstrang. Wird die Sonde in der Extensionsphase der PCR durch die 5' → 3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase geschnitten, kann der Reporterfarbstoff frei gesetzt werden und durch die fehlende räumliche Nähe zum Quencher frei fluoreszieren. Durch Akkumulation der PCR-Produkte steigt das Fluoreszenzsignal an. Dieses Signal wird durch einen Laser angeregt und durch einen Detektor im Zyklus erkannt und seine Intensität gemessen. Die Emissionsintensität wird vom Gerät in Echtzeit ermittelt und mit Hilfe des Programms normalisiert [Emissionsintensität Reporterfarbstoff geteilt durch die Emissionsintensität des passiven Referenzfarbstoffes,  $\Delta R_n = (R_n^+) - (R_n^-)$ ] und in einen  $C_T$ -Wert (Threshold Cycle, mittlere Standardabweichung von  $R_n$  in den ersten 13 - 15 Zyklen \* einstellbarer Faktor) umgerechnet. Der  $C_T$ -Wert gibt an, bei welchem PCR-Zyklus ein erster signifikanter Anstieg des  $\Delta R_n$ -Wertes stattfindet.

Die verwendeten TaqMan-Sonden wurden mit FAM (6-carboxyfluorescein) bzw. JOE (2,7-Dimethoxy-4,5-dichloro-6-carboxyfluorescein) als Reporterfarbstoffe markiert, während TAMRA (5-carboxytetramethylrhodamine) bzw. DABCYL (Dark Quencher) als Quencherfarbstoff fungierten. Durchgeführt wurde die Real-Time-PCR mit einem kommerziellen Master Mix (2x TaqMan Master Mix, Applied Biosystems). Der Master Mix besteht aus dNUTPs, einer thermostabilen Taq-Polymerase,  $MgCl_2$  sowie Uracil-DNA-Glycosylase (UDG). Primer, Sonde,  $H_2O$  und Template wurden dem Mix zugesetzt.

## PCR Mix

Reagenzien	Volumen
2x TaqMan Master Mix	6,25 µl
Sens Primer (10 µM)	0,75 µl
Revers Primer (10 µM)	0,75 µl
Sonde (10 µM)	0,25 µl
Template-DNA	1-10 µl
H <sub>2</sub> O	ad 25 µl

## PCR Profil

Temperatur	Zeit	Zyklen
50 °C	2 Min	
95 °C	10 Min	
95 °C	15 Sek	45
60 °C	60 Sek	
4 °C	∞	

### 2.16.5 PCR-Produktaufreinigung

Das PCR-Amplifikat wurde für die Weiterverwendung aufgereinigt, um Kontaminationen mit Restprimern und anderen PCR-Mix-Substanzen zu entfernen. Die DNA-Fragmente wurden mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ gereinigt. Eluiert wurde die DNA in 60 µl H<sub>2</sub>O.

### 2.16.6 Gelextraktion

Die DNA wurde auch direkt aus präparativen Agarosegelen eluiert und gereinigt. Dazu wurde die gewünschte DNA-Bande ausgeschnitten und entsprechend dem Protokoll „Jetquick Gel Extraction Spin Kit“ weiter verarbeitet.

## 2.17 Klonierung

### 2.17.1 Klonierung von PCR-Produkten

Ziel der Klonierung ist das Integrieren einer Ziel-DNA-Sequenz in einen Plasmidvektor. Wird dieser Plasmidvektor in Bakterien transformiert und die Bakterien vermehrt, erhält man eine große Anzahl von rekombinanten Plasmid-Klonen. Zunächst wird das frische PCR-Produkt in den bakteriellen Vektor ligiert. Im nächsten Schritt wird der Vektor mit dem Insert in kompetente *E. coli*-Bakterien transformiert. Die transformierten Bakterien werden anhand einer Resistenz-Selektion kultiviert und die Kolonien mit dem gewünschten Plasmid isoliert und gereinigt.

Das frische PCR-Produkt wurde mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kits (Invitrogen, Karlsruhe) in den Plasmid Vektor pCR®II-TOPO® ligiert. Der verwendete Plasmid-Vektor liegt in linearisierter Form vor und ist kovalent mit einer Topoisomerase I des *Vaccinia-Virus* verbunden. Dieses Enzym ligiert das PCR-Produkt mit dem Vektor. Ferner hat der Vektor einen 3'-Thymidin-Überhang. Dadurch können die Adenosinlagerungen, die von der Taq-Polymerase an das 3'-Ende des PCR-Produktes gehängt werden, eine effiziente Bindung mit dem Vektor eingehen (terminale Transferase-Aktivität). Der Vektor trägt zudem ein Kanamycin- sowie ein Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion der Bakterien, die mit dem Vektor transformiert sind. Der Ligationsmix wurde auf Eis pipettiert und dann für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

#### Ligationsansatz

Reagenzien	Volumen
Salt Solution	1 µl
Vektor pCR®II-TOPO®	0,5 µl
PCR-Produkt	1 µl
H <sub>2</sub> O	ad 5 µl

Nach Insertion der DNA in den Vektor wurde das Plasmid in kompetente Zellen (*E. coli* Stamm XL1-blue) transformiert. Dazu wurden 5 µl des Ligationsansatzes in 50 µl Z-kompetente Zellen (OD<sub>600</sub> = 0,6) transformiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Agarplatten mit LB-Medium und Ampicillin wurden mit einem Induktor: 4 µl IPTG (0,1 M)

und einem Laktoseanalog: 20 µl X-Gal (40 mg/ml) versetzt, um eine Induktion der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von Bakterien durchzuführen. Durch die Insertion des Amplifikates kommt es zu einer Verschiebung des Leserahmens in den Rekombinanten und das *lacZ'* $\alpha$ -Gen des Plasmids wird nicht exprimiert. Die Bakterien können keine funktionelle  $\beta$ -Galaktosidase herstellen und sind optisch an der Weißfärbung der Kolonie zu erkennen.

Die transformierten Bakterien wurden auf LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Weiße Kolonien repräsentierten Bakterien mit rekombinanten Plasmid. Diese wurden mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen und auf das Vorhandensein des rekombinanten Plasmids in der Kolonien-PCR untersucht.

### 2.17.2 Präparation von kompetenten Zellen

Kompetente *E. coli* Zellen wurden mit Hilfe des „Z-Competent *E.coli* Transformation Kit“ (Zymo Research, USA) hergestellt. Es wurden jeweils Aliquots mit 100 µl Zellen bei -70 °C gelagert. Die Qualität der kompetenten Zellen wurde mit Hilfe des Kontrollplasmids (pEMBL Vektor, Ampicillin-Resistenz) untersucht. Dazu wurden 100 µl kompetente Zellen mit dem genannten Vektor transformiert und inkubiert. Die Kolonien wurden gezählt und die Transformationseffizienz bestimmt: Anzahl transformierter Zellen pro 1 µg Plasmid-DNA. Es wurden lediglich kompetente Zellen mit einer Transformationsrate von  $> 10^6$  pro 1 µg DNA für die Versuche verwendet.

### 2.17.3 Kolonien-PCR

Um eine erfolgreiche Plasmid-Insertion des DNA-Amplifikates zu überprüfen, wurde die Zielsequenz von rekombinanten Bakterienkolonien in einer Kolonien-PCR amplifiziert. Dazu wurden weiße Kolonien der Agarplatte mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen und in dem PCR-Ansatz überführt. Die PCR wurde mit den im Vektorplasmid vorhandenen Primersequenzen T7 und M13 durchgeführt.



## PCR Mix

Reagenzien	Volumen
10x-NH <sub>4</sub> -Puffer	5 µl
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	2 µl
dNTPs (2,5 mM)	4 µl
T7-Primer (10 µM)	1,5 µl
M13-Primer (10 µM)	1,5 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl
Template-DNA	1-10 µl
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl

## PCR Profil

Temperatur	Zeit	Zyklen
94 °C	4 Min	
94 °C	30 Sek	
55 °C	30 Sek	30
72 °C	45 Sek	
72 °C	10-15 Min	
4 °C	∞	

#### 2.17.4 Präparation von rekombinanten Bakterienkulturen

Zur Anzucht von rekombinanten *E. coli* Bakterien mit der gewünschter Sequenz wurden Bakterien von weißen Bakterienkolonien der LB-Agarplatte in 3 ml LB-Flüssigmedium überführt und auf einem Schüttler für 12 - 15 Stunden bei 37 °C inkubiert. Das Flüssigmedium wurde vor dem Beimpfen mit 3 µl Ampicillin (100 ng/ml) versetzt, um eine Resistenzselektion durchzuführen.

### 2.17.5 Plasmidisolierung

Um die Plasmide aus den Bakterien der Flüssigkultur zu isolieren, wurden 1,5 ml der Übernachtskultur anhand des Protokolls „Isolation of plasmid DNA from *E. coli*, NucleoSpin Plasmid Kits“ aufgearbeitet. Zunächst wurde das Bakterienpellet lysiert und das Lysat durch chaotrope Salze auf die Silikamembran der Säule gebunden. Durch Waschen der Membran wurden kontaminierende Substanzen wie Proteine und RNA von der Membran entfernt und die Plasmid-DNA anschließend eluiert. Die Elution erfolgte in zwei Arbeitsschritten, bei denen jeweils 30 µl H<sub>2</sub>O bzw. Elutionspuffer auf die Säule gegeben wurde mit anschließendem Zentrifugationsschritt. Abschließend wurde die Plasmidlösung einer photometrischen Konzentrationsbestimmung unterzogen.

### 2.17.6 Plasmidverdünnung für die Real-Time-PCR

Für die Real-Time-PCR wurden Plasmidstandards zur Quantifizierung von Proben unbekannter Kopienzahl verwendet. Dazu wurde zunächst die Konzentration der Plasmide photometrisch ermittelt. Die Berechnung der Kopienzahl pro µl zeigt das folgende Beispiel:

---

PCR-Produkt:	144 bp
Vektorgröße:	<u>+ 3900 bp</u>
insgesamt:	4044 bp
Molekülmasse	= Produktgröße * Molmasse für doppelsträngige DNA
	= 4044 * 660 g/mol
	= 2,6 * 10 <sup>6</sup> g/mol
	2,6 * 10 <sup>6</sup> g/mol = 6,022 * 10 <sup>23</sup> Avogadro-Konstante
	2,6 ng = 6,022 * 10 <sup>8</sup> Moleküle
	1 ng = 2,3 * 10 <sup>8</sup> Moleküle
OD-Konzentration	= 33,5 ng /µl
2,3 * 10 <sup>8</sup> * 33,5 ng/µl	= 7,7 * 10 <sup>9</sup> Moleküle /µl in der Ausgangsprobe

---

### 2.18 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA, zur Identifizierung der genauen Reihenfolge von Nukleotiden in einem bestimmten Oligonukleotidabschnitt, erfolgte nach dem Kettenabbruch-Prinzip von

Sanger (Sanger et al. 1977). In einem Sequenzierungsansatz werden durch die Zugabe einer DNA-abhängige-DNA-Polymerase, eines Oligonukleotidprimers, den vier dNTPs sowie von vier Didesoxynukleotiden (ddNTPs) unterschiedlich lange komplementäre DNA-Sequenzen hergestellt (Kettenabbruch). Die unterschiedliche Länge der Polynukleotidstränge beruht darauf, dass den ddNTPs eine Hydroxylgruppe in der 3`-Position des Zuckeranteils fehlt und es damit zum Kettenabbruch kommt. Jedes ddNTP ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, der durch einen Laser angeregt wird, so dass die Emission des Farbstoffes detektiert werden kann.

### Sequenzreaktion (Cycle sequencing)

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden sowohl PCR-Produkte als auch Plasmide sequenziert. Zunächst wurde die DNA von kontaminierenden Substanzen gereinigt. Je nach Größe des PCR-Produktes wurden 1 - 20 ng DNA bzw. 150 - 300 ng Plasmid-DNA in die Sequenzierungsreaktion eingesetzt. Es wurde ein Premixkit (Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit) verwendet. Als Primer wurde ein spezifischer Primer verwendet, wenn PCR-Produkte sequenziert werden sollten. Für die Analyse von Plasmiden wurde der Primer T7 oder M13 eingesetzt. Plasmide und PCR-Amplifikate wurden in der Regel von beiden Seiten sequenziert, so dass für den Genombereich die Information für beide DNA-Stränge vorlag.

### Sequenzierungsmix

Reagenzien	Volumen
DNA	1-4 µl
sens/antisens Primer (10 µM)	0,5 µl
5x Puffer	1µl
Big Dye 3.1 Premix	2 µl
H <sub>2</sub> O	ad 10 µl

### Sequenzierungs-Profil

Temperatur	Zeit	Zyklen
96 °C	2 Min	
96 °C	10 Sek	
45 - 60 °C	5 Sek	25
60 °C	4 Min	
4 °C	∞	

### Reinigung der Sequenzierungsprodukte

Zur Entfernung von nicht eingebauten fluoreszierenden ddNTPs wurden die Sequenzierungsprodukte mittels Sephadex-Säule aufgereinigt, durch Lyophilisierung konzentriert und anschließend das Lyophilisat in einem Denaturierungspuffer (Hi-Di-Puffer, ABI) gelöst.

### Sequenzierungsgel

In einem Pop6-Gel (ABI) wurden die Sequenzierungsprodukte nach Größe aufgetrennt und die Fluoreszenz mit einem ABI-PRISM Sequenzer 3100 Genetic Analyser, 16 Kapillaren: 50 cm Länge gemessen. Die Auswertung der Fluoreszenzsignale erfolgte mit einem „Sequence Analysis Software“ (ABI).

### Analyse der Sequenzdaten

Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mittels des „Basic Local Alignment Search Tool BLAST“ der Datenbank des National Centers for Biotechnology Information, NCBI. Mit den Programmen blastn oder bl2seq wurden die Sequenzen mit den Datenbankeinträgen verglichen.

## 2.19 Serologische Diagnostikmethoden

### 2.19.1 Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay (ELISA)

Zum quantitativen Nachweis von IgG-Antikörpern gegen das *West-Nil-Virus* in menschlichem Serum wurden verschiedene Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay-Systeme (ELISA)

durchgeführt. Die Anwendung der ELISA-Kits erfolgte nach den Angaben der Hersteller (Focus Technologies, EUROIMMUN AG, Panbio Limited).

### **2.19.2 Indirekter Immunfluoreszenztest (IFT)**

Mit Hilfe des indirekten Immunfluoreszenztests (IFT) wurden Antikörper gegen das *West-Nil-Virus* in Serum und Plasma verschiedener Spezies nachgewiesen. Für die Untersuchungen wurde ein kommerzielles Produkt der Firma EUROIMMUN AG mit WNV-infizierten Zellen verwendet. Für humane Proben wurde der Test nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Untersuchung von equinen und aviären Proben wurde das IFT-Protokoll des Herstellers für den WNV-IFT adaptiert.

#### **Untersuchung von aviären Proben**

Zunächst wurde eine Pufferlösung mit PBS und 0,2 % Tween 20 angesetzt. Die Proben wurden mit diesem Phosphatpuffer 1:10 verdünnt. 30 µl der Probe wurden auf ein Inkubationsfeld der Pipettierschablone pipettiert. Der Objektträger wurde auf die Schablone gelegt, so dass mit die infizierten Zellen des Biochips in Kontakt und mit dem Probentropfen kamen. Es folgte eine Inkubation von 30 Minuten bei Raumtemperatur. Der Objektträger wurde mit PBS-Tween gewaschen. In der Zwischenzeit wurde das Anti-Tauben-IgG-Hyperserum (nicht Fluoreszenzmarkiert) aus Kaninchen 1:200 in PBS mit 0,2 % Tween 20 verdünnt. 25 µl des vorverdünnten Hyperserums wurden auf die gewaschenen Inkubationsfelder der Pipettierschablone pipettiert und die Biochipfelder in Kontakt zum Hyperimmunserum gebracht und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgte ein weiterer Waschschrift. Der FITC-gekoppelte IgG-Bird-Antikörper wurde ebenso wie der FITC-gekoppelte anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (zum Nachweis des Hyperimmunserums) 1:50 verdünnt. Beide Antikörper wurden vermischt und 25 µl der Antikörpersuspension auf die Inkubationsfelder pipettiert. Es folgte ein weiterer Inkubationsschritt von 20 Minuten sowie ein nachfolgender Waschschrift. Als externe Kontrolle wurde jeweils ein WNV-reaktives Serum mitgeführt. Das Eindecken der Biochipfelder erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Fluoreszenz wurde mikroskopisch an einem Fluoreszenzmikroskop beurteilt. Die Objektträger wurden für die Langzeitlagerung im Dunklen bei -20 °C aufbewahrt.

## Untersuchung von equinen Proben

Der indirekte Immunfluoreszenztest zum Nachweis von *West-Nil-Virus*-Antikörpern in Pferdeseren wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei der Antikörper gegen humanes IgG des Kits durch einen Goat-anti-Horse-FITC-markierten Antikörper ausgetauscht wurde und ein equines Kontrollserum mit bekanntem WNV-IF-Titer mitgeführt wurde.

Zu Identifikation von Kreuzreaktion innerhalb der Flaviviren wurden auch IFTs der Firma EUROIMMUN AG gegen *Gelbfiebervirus*, *Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus* und *Denguevirus* entsprechend den Herstelleranweisungen eingesetzt. Als reaktiv wurde eine Probe beurteilt, wenn der Titer  $\geq 10$  war. Bei der Untersuchung von *Denguevirus* Typ1-4 wurden Proben als negativ bewertet, wenn sie lediglich für einen Serotyp einen Titer = 10 aufwiesen.

### 2.19.3 Virusneutralisationstests

#### **Mikrotiter-Neutralisationstest zum Nachweis von neutralisierenden Antikörpern gegenüber *West-Nil-Virus***

Für den Nachweis von neutralisierenden Antikörpern gegen das *West-Nil-Virus* wurde ein Mikrotiter-Neutralisationstest (NT) etabliert. Diese Methode wurde gewählt, da für dieses Verfahren nur geringe Volumina an Antikörpern benötigt werden. Am Vortag des Versuches wurden Vero E6-Zellen (100  $\mu$ l/Well) mit einer Zellzahl von  $1 \cdot 10^5$  Zellen/ml auf 96-Well-Platten für Zellkultur ausgesät. Für das erste Screeningverfahren wurde zunächst eine Serum- oder Plasmaverdünnung von 1:10 untersucht. Für jede Probe wurde ein Doppelansatz ausgeführt und die Probe in der Einzelbestimmung als Serumkontrolle ohne Viruszugabe auf zytotoxische Effekte gegenüber den Zellen untersucht. In einer 96-Well Platte mit v-Boden wurden die Proben 1:10 in einem Endvolumen von 25  $\mu$ l in PBS verdünnt. Pro Platte wurde ein Kontrollserum mitgeführt, dessen Neutralisationstiter bekannt war. Dieses Kontrollserum wurde dreistufig austitriert. In einem Sicherheitslabor der Stufe BSL3 wurde ein Aliquot des Isolates WNV-Israel mit bekanntem Virustiter auf 500 TCID<sub>50</sub>/ml in D-MEM-Medium (mit 10 % FKS, 1 % Ciprofloxacin) verdünnt. 25  $\mu$ l der Virusverdünnung wurden mit den Proben vermischt. Dabei wurden pro Platte mindestens zwei Wells für eine Zellkontrolle virusfrei

gehalten. Zwei Wells pro Platte waren für die Viruskontrolle bestimmt. Die Platten wurden mit Parafilm abgedichtet und für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Virus-Probensuspension auf die mit Zellen bewachsene Platte überführt.

Bei der Untersuchung von Serumproben wurde die Zellen für 3 Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Für die Analyse von Plasmaproben wurde das Virus-Plasmagemisch nach 1 Stunde von den Zellen abgenommen und durch 50 µl frisches Medium ersetzt. Für die Untersuchung von Blutproben in APS-Puffer wurde der Test insofern adaptiert, als dass Medium mit Gentamicin (1 µg/ml) verwendet wurde, um eine Vermehrung von kontaminierenden Bakterien in den Blutproben zu verhindern.

Nach 3 Tagen wurden die Platten mit 100 µl Formaldehyd (1:5 verdünnt) pro Well für 10 Minuten fixiert. Die Platten wurden anschließend in einem Bad von Formaldehyd (1:10 verdünnt) getaucht. Unter einem Abzug wurde das Formaldehyd entfernt und der Zellmonolayer mit 200 µl Naphtalenblack (Amidoschwarz) pro Well für 30 Minuten gefärbt. Das Naphtalenblack wurde von den Zellen entfernt, die Zellen mit Leitungswasser gewaschen und die Platte unter einen Mikroskop analysiert.

Wells in denen der Zellrasen intakt blieb wurden als neutralisierend (seropositiv) beurteilt. Proben, die zu zytopathischen Effekten (CPE) führten (Löcher im Zellrasen durch Schrumpfung morphologisch veränderter Zellen), während die Serumkontrolle einen intakten Zellrasen zeigte, wurden als negativ beurteilt. Diese Proben enthielten keine neutralisierenden Antikörper. Proben deren Serumkontrolle einen zerstörten Zellrasen (CPE) bildete, wurden als nicht auswertbar definiert. Proben mit neutralisierenden Antikörpern wurden in einem zweiten Schritt austitriert, d.h. die Probe in den Verdünnungsstufen 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 ... 1:2560 nach dem oben beschriebenen Prinzip in dem Neutralisationstest eingesetzt. Der Neutralisationstiter wurde bestimmt als die höchste Serumverdünnung, bei der 50 % der Zellen gegen die Virusinfektion mit einem bestimmten Virustiters „geschützt“ sind (Mayr et al. 1977). Der Wert wurde als reziproker Wert angegeben, wobei ein Neutralisationstiter < 10 als nicht neutralisierend (negativ) gewertet wurde.

**Plaque-Reduktionsneutralisationstest zum Nachweis von neutralisierenden Antikörpern gegen das *Usutu-Virus***

Während im Mikrotiter-Neutralisationstest die Wells durch eine „Alles oder nichts“-Reaktion beurteilt werden, wird beim Plaque-Reduktionsneutralisationstest (PRNT) auch eine partielle Neutralisation erfasst. Die Plaques, die nach Beimpfen des Virus-Serumgemisches im Zellmonolayer entstehen, werden gezählt, um Reduktionen in der Infektiösität quantitativ zu erfassen (Mayr et al. 1977). Zur Identifikation von neutralisierenden Antikörpern gegen das *Usutu-Virus* wurde der Test auf 48-Well-Zellkulturplatten durchgeführt. Vero E6-Zellen mit einer Zellzahl von  $2 \cdot 10^5$  Zellen/ml (200  $\mu$ l/Well) wurden am Vortag ausgesät. Für die Neutralisationsreaktion wurden die Proben 1:5 bis 1:320 in PBS verdünnt und 50  $\mu$ l der Proben wurden in einer Mikrotiterplatte mit 50  $\mu$ l *Usutu-Virus* Stamm Vienna 2001 from Austria (Virustiter: 150 PFU/ml) vermischt, so dass eine Verdünnungsreihe von 1:10 bis 1:640 in Doppelbestimmung untersucht wurde. Die Suspension wurde eine Stunde bei 37 °C inkubiert und dann auf die Zellen in der 48-Well-Platte gegeben. Nach einer Stunde wurden die Zellen, mit Carboxymethylcellulose-Zellkulturmedium (300  $\mu$ l/Well) beschichtet. Die Zellen wurden 3 Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, während das Gemisch aus Plasma und Virus nach 1 Stunde von den Zellen abgenommen wurde und durch frisches D-MEM-Medium (mit 10 % FKS, 1 % Ciprofloxacin bzw. Gentamicin bei Singvogelproben) ersetzt wurde. Es folgte eine Beschichtung mit CMC und eine dreitägige Inkubation. Auf jeder Platte wurde ein Serum mit bekanntem Neutralisationstiter austitriert sowie Zellkontrollen und Viruskontrollen mitgeführt. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Zellen mit Formaldehyd (1:10 verdünnt) fixiert und mit Naphtalenblack gefärbt. Die Plaques jedes Wells wurden gezählt und der PRNT<sub>90</sub>- und PRNT<sub>50</sub>-Titer nach Reed und Münch (Reed und Münch 1938) berechnet. Neutralisationstiter von < 10 wurden als nicht neutralisierend (negativ) definiert, Proben mit neutralisierenden Antikörpern wurden als seropositiv gewertet. Parallel zum Neutralisationstest wurde das verwendete Virusstockaliquot austitriert.

**Plaque-Reduktionneutralisationstest zum Nachweis von neutralisierenden Antikörpern gegen das *Gelbfiebertvirus***

Der Nachweis von neutralisierenden Antikörpern gegen das *Gelbfiebertvirus* beruhte auf dem Plaquereduktionstest von De Madrid und Porterfield (De Madrid und Porterfield 1969) und



der Modifikation von Reinhardt et al. (Reinhardt et al. 1998). PS-Zellen mit einer Konzentration von  $3 - 4 \cdot 10^5$ /ml wurden auf 24-Well-Platten (200  $\mu$ l/Well) ausgesät und über Nacht kultiviert. 0,3 ml Serum und 0,3 ml *Gelbfiebervirus* Stamm D 17 mit 100 PFU/ml wurden gemischt und 200  $\mu$ l der Suspension in einer Verdünnungsreihe mit einer Verdünnung von 1:10 bis 1:320 austitriert. Es wurden jeweils Doppelwerte pro Verdünnungsstufe angesetzt. Nach einer Stunde Inkubation von Serum und Virus wurde die Suspension auf die Zellen überführt und nach 4 Stunden mit einer 1,6 % CMC/L-15-Lösung überschichtet (400  $\mu$ l/Well). Die Kulturen wurden 5 Tage bei 37 °C ohne CO<sub>2</sub> inkubiert. Das CMC wurde entfernt, die Zellen mit Formaldehyd (1:10) fixiert und mit Naphtalenblack gefärbt. Die Plaques wurden gezählt und der PRNT<sub>90</sub>-Titer nach Reed und Münch (Reed und Münch 1938) bestimmt. Neutralisationstiter von < 10 wurden als nicht neutralisierend (negativ) interpretiert, während Seren mit neutralisierenden Antikörpern als seropositiv gewertet wurden.

#### **2.19.4 Antikörpergewinnung aus getropftem getrockneten Blut**

Aus Vollblut, welches auf Filterpapier getropft und getrocknet wurde, sollten Antikörper isoliert werden. Für den Antikörpernachweis mittels Virus-Neutralisationstest und Immunfluoreszenztest wurde die vierfache Menge des Blutvolumens an PBS „ohne“ auf die Discs aus vorgestanzten Filterpapieren getropft und diese in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt dessen Spitze entfernt wurde. Dieses Gefäß wurde in ein weiteres 2 ml Reaktionsgefäß plziert und 3 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde für die serologischen Untersuchungen aufgehoben, während der Filterdisc verworfen wurde. Die Antikörpersuspensionen wurden bei -20 C gelagert.

## **2.20 Virologische Methoden**

### **2.20.1 Virusanzucht**

Um serologische Methoden zur Identifizierung von Antikörpern durchzuführen sowie für molekularbiologische Bestimmungen, wurden von verschiedenen Flavivirusisolaten Virusstocks auf Zellen angezüchtet. Dazu wurden fast 100 % konfluente Zellen trypsinisiert, in 20 ml Medium aufgenommen und bei 800 rpm für 3 Minuten zentrifugiert, um das Trypsin zu

entfernen. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 10 ml Medium aufgenommen und mit 100 µl Virussuspension vermischt und in 2 Zellkulturflaschen (175 cm<sup>2</sup>) ausgesät. An den folgenden Tagen wurden die Zellen unter dem Mikroskop untersucht. Zu dem Zeitpunkt bei dem ca. 60 % - 70 % des Zellenrasens zerstört war, wurden die Zellen in der Flasche abgeschabt und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei Raumtemperatur für 10 Minuten bei 4500 rpm zentrifugiert. Nach dem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand abgenommen und aliquotiert. Die Aliquots wurden bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 2.20.2 Virustiterbestimmung von Flaviviren

Zur Bestimmung von Virusmengen in Suspensionen werden üblicherweise die infektiösen Einheiten quantifiziert. Dazu wurden für die Studien zwei Methoden angewendet.

#### Bestimmung der Kulturinfektiösen-Dosis 50

Der Titer der Virusüberstände wurde zum einen anhand der Kulturinfektiösen-Dosis 50 (TCID<sub>50</sub>: tissue-culture infectious dose 50 %) quantifiziert. Dazu wurde eine Virustitration mit Endpunktverdünnung durchgeführt. Vero E6-Zellen (100 µl/Well) mit einer Zellzahl von 1\*10<sup>5</sup> Zellen/ml wurden auf einer Mikrotiterplatte (96-Well-Platte) ausgesät. Die Virusüberstände wurden seriell 1:10 in D-MEM-Medium (mit 10 % FKS und 1 % Glutamin) verdünnt und jeweils 100 µl Virus in 8 Wells parallel auf die Zellen gegeben. Nach drei Tagen wurden die Platten mit Formaldehyd (1:10 verdünnt) fixiert und mit Naphtalenblack gefärbt. Die Auswertung des Zellrasens wurde mit dem Mikroskop durchgeführt. Die Verdünnung, bei der 50 % der Zellkulturen einen zytopathischen Effekt aufweisen, entspricht der Kulturinfektiösen-Dosis 50 (TCID<sub>50</sub>). Dazu wurde die Formel von Spearman und Kärber (Mayr et al. 1977) verwendet:

---



---


$$\text{Titer/ml} = D^{(n/p + 0,5)} / D_0 * D * V$$

D = Verdünnungsfaktor

N = Anzahl positiver Wells

P = Anzahl der Parallelbestimmungen

D<sub>0</sub> = erster Verdünnungsschritt

V = Volumen in ml

---

### Bestimmung der Plaque-bildenden Einheiten

Die zweite Methode basiert auf der Bestimmung der Plaque-bildenden Einheiten (PFU: plaques forming units) durch Auszählung der „Löcher“ = Plaques im Zellmonolayer (zerstörter Zellrasen). Auch hier wurden serielle Verdünnungen der Virussuspension angefertigt und auf Zellen gegeben. Die Zellkulturen wurden danach mit einem Overlay (CMC-Zellkulturmedium) überzogen, so dass eine Ausbreitung des Virus nur über direkten Zell-Zellkontakt erfolgen konnte. Durch Färbung der Zellen mit Naphtalenblack konnten die Plaques sichtbar gemacht werden. Die Bestimmung des PFU/ml erfolgte wie in dem nachfolgenden Beispiel beschrieben:

Virusverdünnung	Mittlere Plaquezahlen	Volumen aller Wells
$10^{-1}$	nicht zählbar	wird nicht verrechnet
$10^{-2}$	110	0,8
$10^{-3}$	17	0,08
$10^{-4}$	2	0,008
$10^{-5}$	0	wird nicht verrechnet
Summe	129	0,888
<b><math>129 \cdot 100 / 0,888 = 1,5 \cdot 10^4</math> PFU/ml</b>		

### 2.20.3 Inaktivierung von Viren

Für einige Versuche wurden die Virusüberstände inaktiviert. Dazu wurden Aliquots des Virusüberstandes für 30 Minuten bei 56 °C im Wasserbad inkubiert und bis zur Verwendung bei -70 °C eingefroren.

## 2.21 Zellkultur

### 2.21.1 Auftau- und Einfrierprozess

Eukaryote Zellen lassen sich in Stickstoff dauerhaft lagern und können bei Bedarf reaktiviert werden. Im Folgenden wird beschrieben wie die Verfahren zum Einfrieren und Auftauen durchgeführt wurden.

### **Einfrierprozess**

Ausgehend von einer konfluenten Zellkulturflasche (125 cm<sup>2</sup>) wurden 3 Aliquots zu 1,8 ml eingefroren. Zunächst fand eine Trypsinierung der Zellen statt, die dann in 20 ml Medium aufgenommen wurden. Die Zellsuspension wurde für 3 Minuten bei 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 2,7 ml Medium gegeben und mit 2,7 ml Einfriermedium (20 % DMSO und 80 % FKS) versetzt. 1,8 ml Zellsuspension wurden in Kryoröhrchen (1,8 ml mit Innengewinde, Nunc) aliquotiert und in einer Verpackung von Zellstoff und Styropor für 1 Stunde bei 4 °C gehalten, um eine kontinuierliche und schonende Abkühlung zu erreichen. Danach wurden die Zellen bei -70 °C für 24 Stunden eingefroren und dann zur Dauerlagerung in einen Stickstofftank (-180 °C) transferiert.

### **Auftauprozess**

Ein Kryoröhrchen mit Zellen wurde zügig in warmen Wasser aufgetaut, mit Alkohol gesäubert und in ein Zentrifugationsröhrchen mit 15 ml Medium D-MEM (10 % FKS, 1 % Glutamin) überführt. Das Röhrchen wurde bei 800 rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 5 ml Medium aufgenommen und resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine mittlere Zellkulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) überführt und mit 20 ml Medium aufgefüllt. Es folgte eine Inkubation der Zellen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 24 Stunden. Die Zellen wurden auf ihren Zustand unter dem Mikroskop kontrolliert, das Medium abgenommen und durch frisches Medium ersetzt.

## **2.21.2 Kultivierung von Zellen**

Die Kultivierung von Zellen erforderte geeignete Sicherheitsmaßnahmen, um mikrobiologische Kontaminationen zu vermeiden. Daher wurden sämtliche Reagenzien sterilfiltriert oder sterilisiert, an sterilen Arbeitsbänken gearbeitet und die Zellen in Einweg-Zellkulturflaschen gehalten.

Bei Konfluenz der adhärennten Zellen wurden diese umgesetzt. Dazu wurde das Medium abgenommen und die Zellen (Vero E6, Hep2) mit Diluent (+ 0,2 % EDTA) gespült. Die Zellen wurden vom Zellflaschenboden mit Trypsin abgelöst und in D-MEM-Medium mit Anteilen von 10 % FKS und 1 % Glutamin entsprechend der Teilungsrate (1:3 - 1:20) aufgenommen und in neue Zellkulturflaschen überführt. Zellen wie C6/36 und PS-Zellen

wurden bei Konfluenz mit einem Zellschaber vom Boden abgelöst und in frisches Medium (L15-Medium) aufgenommen, geteilt und in neue Zellkulturflaschen überführt.

Für die Aussaat von Zellen musste die Zahl der Zellen bestimmt werden. Dafür wurden die Zellen trypsiniert und in einem Volumen von 20 ml Medium aufgenommen. 10 µl der Suspension wurden mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer gezählt (alle vier großen Eckquadrate). Die mittlere Summe wurde mit  $10^4$  (Kammerkonstante) multipliziert und entsprach dann der Zellzahl pro ml.

### 2.21.3 Mykoplasmen-PCR

In regelmäßigen Abständen wurden die Zellkulturen auf Kontamination mit Mykoplasmen getestet. Die intra- und extrazellulär wachsenden Bakterien können sowohl Stoffwechsel als auch Zellwachstum beeinflussen. Daher sollten nur Mykoplasmen-freie Zellkulturen für Experimente eingesetzt werden. Nach Kultivierung der Zellen in den ersten Passagen sowie vor Einfrieren der Zellen wurde Kulturüberstand abgenommen und in einer spezifischen PCR getestet. Es wurde jeweils eine Negativkontrolle und eine Mykoplasmen-positive Kontrolle in der PCR mitgeführt.

#### Mykoplasmen PCR-Mix

Reagenzien	Volumen
10x Puffer	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1 µl
dNTPs (2,5 mM)	1 µl
Primermix (GPO-3, MGSO, 10µM)	1 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl
Template (Überstand, 1:10 verdünnt)	10 µl
H <sub>2</sub> O	ad 25 µl

## PCR Profil

Temperatur	Zeit	Zyklen
95 °C	5 Min	
95 °C	30 Sek	40
55 °C	30 Sek	
72 °C	30 Sek	
4 °C	$\infty$	

## 2.22 Statistische Auswertungen

Zum Nachweis der Sensitivitätsgrenze der ProC-TaqMan-PCR wurde das statistische Verfahren der Probit-Analyse verwendet. Die Probit-Analyse wurde mit Hilfe des Programms SPSS, Version 13.0 (SPSS Inc., USA) durchgeführt. Weiterhin wurde für epidemiologische Fragestellungen der t-Test verwendet (Prism 3.02, GraphPad Software) sowie der Chi<sup>2</sup>-Test. Ferner wurden Konfidenzintervalle, Standardfehler und Standardabweichungen berechnet.