

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Bezugsquellennachweis

##### 2.1.1.1 Geräte

|   |  |
|---|--|
| Analysenwaage (BP 310 P)  | Sartorius, Göttingen   |
| Autoklav (Automat 21/2)   | Webeco, Bad Schwartau  |
| Brutschränke:   |  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• für Bakterienkultur (mit Schüttler)</li> <li>• für Zellkultur</li> </ul> | New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA<br>Heraeus, Hanau      |
| Dewar-Isoliergefaß  | Roth, Karlsruhe  |
| Folienschweißgerät für TaqMan <sup>®</sup> -Platten   | ABgene, Epsom, Surrey, UK  |
| Gefrierschränke:  |  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• für -20 °C</li> <li>• für -80 °C</li> </ul>                              | Bosch, Stuttgart/ Liebherr, Biberach a. d. Riß<br>Heraeus, Hanau |
| Gelelektrophoresesysteme, horizontal  | Biozym, Oldendorf  |
| Glasröhrchen mit Deckel (für Eponeinbettung)  | Roth, Karlsruhe  |
| Glaswaren (Kolben, Flaschen usw.)   | Schott Glas, Mainz   |
| Kühlschränke  | Bosch, Stuttgart/ Philipp Kirsch, Offenburg                      |
| Mikroskope:   |  |
| Fluoreszenzmikroskop (Axioskop 20)  | Zeiss, Jena  |
| Invertmikroskop (Axiovert 25)   |  |
| Konfokales Laser Scanning Mikroskop (cLSM510)   |  |
| Lichtmikroskop (Axiophot)   |  |
| Transmissionselektronenmikroskop (EM 10 A/B)  |  |
| Neubauer-Zählkammer   | Roth, Karlsruhe  |
| Photometer:   |  |
| Bio-Photometer  | Eppendorf, Hamburg   |
| Mikrotiterplattenphotometer (EAR 400 AT)  | SLT Laborinstruments Austria, Salzburg, A                        |

|  |  |
|--|--|
| Pinzetten  | Roth, Karlsruhe                          |
| Pipetten (bis 10, 100, 1000 µl)  | Eppendorf, Hamburg                       |
| Pipettierhilfe (Accu-jet® )  | Brand, Wertheim                          |
| Rotationsmischer (R1)  | Pelco International, Redding, CA, USA    |
| Rotoren:   |  |
| HB-6   | Kendro, Langenselbold                    |
| SW28 (für UZF)   | Beckman, Palo Alto, CA, USA              |
| SW40 (für UZF)   | Beckman, Palo Alto, CA, USA              |
| Typ 12145  | B. Braun, Melsungen                      |
| Rotor-Stator-Homogenisator-System:   |  |
| T8 basic Ultra-Turrax®; Dispergierstation                                  | IKA Labortechnik, Staufen                |
| T8.10; Netzgerät T8.01; Dispergierwerkzeuge: S25N-18G, S25N-8G             |  |
| Sequenziergerät<br>(ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer)                      | Applied Biosystems, Foster City, CA, USA |
| Sofortbildkamera   | Polaroid, Offenbach                      |
| Spannungsgeräte  | Biometra, Göttingen/ Bio-Rad, München    |
| Speed-vac-Vakuumanlage:  |  |
| Speed-vac Univapo® 150 ECH, Pumpe und Kühlfalle Unijet II®                 | Uniequip, Leipzig                        |
| Spektrofluorometer (Tecan Spectrafluor® plus)                              | Tecan, Maennedorf, CH                    |
| Stickstoffprobenlagerungstank  | Union Carbide, Houston, TX, USA          |
| Temperierbad (TER2)  | IKA Labortechnik, Staufen                |
| Thermozykler:  |  |
| ABI Prism® Sequence Detector (für TaqMan®)<br>(Typen: 5700, 7700, 7900 HT) | Applied Biosystems, Foster City, CA, USA |
| Biometra T Gradientencycler  | Biometra, Göttingen                      |
| Biometra TRIO Thermoblock mit Heizdeckel                                   | Biometra, Göttingen                      |
| Tiefkühlbox für TaqMan®-Platten mit Alu-Block                              | Nunc, Wiesbaden                          |
| Trimmgerät (TM 60)   | C. Reichert, Wien, A                     |
| Ultramikrotom (Ultracut S)   | C. Reichert, Wien, A                     |
| UV-Tisch (Transilluminator TC-312A)  | Spectroline, Westbury, NY, USA           |
| Vortex®  | Roth, Karlsruhe                          |

Zentrifugen:

|                           |                                    |
|---------------------------|------------------------------------|
| Heraeus Megafuge 1.0 R    | Heraeus, Hanau                     |
| RC 50 Plus Kühlzentrifuge | Kendro, Langenselbold              |
| Sigma 2K15 Kühlzentrifuge | B. Braun, Melsungen                |
| Tischzentrifugen          | Eppendorf, Hamburg/ Heraeus, Hanau |
| Ultrazentrifuge (XL-90)   | Beckman, Palo Alto, CA, USA        |
| Zentrifuge 5403           | Eppendorf, Hamburg                 |

### 2.1.1.2 Chemikalien

Chemikalien wurden mit dem Reinheitsgrad p.A. (*pro analysi*; für analytische Zwecke) oder der höchsten verfügbaren Reinheitsstufe (reinst) verwendet. Mit folgenden Ausnahmen wurden alle Chemikalien von den Firmen Merck Eurolab, Darmstadt und Sigma-Aldrich, München bezogen:

#### **A**

|                        |                       |
|------------------------|-----------------------|
| Agar                   | Invitrogen, Karlsruhe |
| Agarose (NuSieve® 3:1) | Biozym, Oldendorf     |
| Albuminazid            | Euroimmun, Lübeck     |

#### **B**

|            |                   |
|------------|-------------------|
| Bleicitrat | Serva, Heidelberg |
|------------|-------------------|

#### **C**

|                                   |                 |
|-----------------------------------|-----------------|
| CsCl                              | Roth, Karlsruhe |
| Chloroform                        | Roth, Karlsruhe |
| (Roti®-)Chloroform/Isoamylalkohol | Roth, Karlsruhe |

#### **D**

|  |                                |
|--|--------------------------------|
| DBSA (Dodecylbernsteinsäureanhydrid)           | Serva, Heidelberg              |
| DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium)       | Gibco Invitrogen, Karlsruhe    |
| DMP-30 (2,4,6-Tris(dimethylamino)-phenol)      | Serva, Heidelberg              |
| dNTP-Mix [10 mM]                               | Eppendorf, Hamburg             |
| dNTP-Set [100 mM]                              | Amersham Biosciences, Freiburg |
| DTT [0,1 M]                                    | Invitrogen, Karlsruhe          |
| dUTP (2'-Desoxyuridin-5'-Triphosphat) [100 mM] | Amersham Biosciences, Freiburg |

#### **E**

|                |                 |
|----------------|-----------------|
| Ethanol        | Roth, Karlsruhe |
| Ethidiumbromid | Roth, Karlsruhe |

#### **F**

|     |                           |
|-----|---------------------------|
| FKS | PAA Laboratories, Linz, A |
|-----|---------------------------|

#### **G**

|                      |                           |
|----------------------|---------------------------|
| L-Glutamin [200 mM]  | PAA Laboratories, Linz, A |
| Glutaraldehyd [25 %] | Serva, Heidelberg         |

|          |  |  |
|----------|--|--|
|          | Glyceridether 100  | Serva, Heidelberg                            |
|          | GTC (Guanidinthiocyanat)   | Roth, Karlsruhe                              |
| <b>H</b> |  |  |
|          | HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure)                    | Biochrom, Berlin                             |
| <b>L</b> |  |  |
|          | LB-Medium (Luria Broth)  | Invitrogen, Karlsruhe                        |
| <b>M</b> |  |  |
|          | MgCl <sub>2</sub> (Magnesiumchlorid) [50 mM]                               | Eppendorf, Hamburg/<br>Invitrogen, Karlsruhe |
|          | Molekularwasser (für PCR-Zwecke)   | Eppendorf, Hamburg                           |
| <b>N</b> |  |  |
|          | Nicht-essentielle Aminosäuren  | PAA Laboratories, Linz, A                    |
| <b>P</b> |  |  |
|          | Penicillin/Streptomycin [10000 U]<br>(Roti <sup>®</sup> -) Phenol          | PAA Laboratories, Linz, A<br>Roth, Karlsruhe |
|          | Polyvinylformal<br>(Rotipuran <sup>®</sup> -) 2-Propanol                   | Wacker Chemie, München<br>Roth, Karlsruhe    |
| <b>R</b> |  |  |
|          | ROX Referenzfarbstoff (für TaqMan <sup>®</sup> )                           | Tib Molbiol, Berlin                          |
|          | RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium) – Zellkulturmedium | Gibco Invitrogen, Karlsruhe                  |
|          | RT-Puffer [5x]   | Invitrogen, Karlsruhe                        |
| <b>S</b> |  |  |
|          | SDS (Natriumdodecylsulfat)   | ICN Biomedicals, Aurora, OH, USA             |
| <b>T</b> |  |  |
|          | Tanninsäure  | Mallinckrodt, St. Louis, MO, USA             |
|          | Taq-Puffer [10x]   | Eppendorf, Hamburg/<br>Invitrogen, Karlsruhe |
|          | TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA) [5x]  | Eppendorf, Hamburg                           |
|          | Tris-HCl   | Serva, Heidelberg                            |
|          | Trypsin  | PAA Laboratories, Linz, A                    |

### 2.1.1.3 Enzyme

|                 |   |
|-----------------|---|
| M-MLV-RT        | Invitrogen, Karlsruhe                       |
| Proteinase K    | Qiagen, Hilden                              |
| RNase A         | Qiagen, Hilden                              |
| RNase-Inhibitor | Invitrogen, Karlsruhe/<br>Promega, Mannheim |

|                                       |  |
|---------------------------------------|--|
| SuperScript® II Reverse Transkriptase | Invitrogen, Karlsruhe                        |
| Taq-Polymerase                        | Eppendorf, Hamburg/<br>Invitrogen, Karlsruhe |
| UDG (Uracil-DNA-Glykosylase)          | Invitrogen, Karlsruhe                        |

#### 2.1.1.4 Nukleinsäuren (Längenstandards)

|   |   |
|---|---|
| International PVB19 DNA Standard (99/800) | NIBSC, South Mimms, Potters Bar,<br>UK              |
| Lambda-DNA-Standard                       | Molecular Probes, Leiden, NL                        |
| 100-bp Marker (Ladder/Leiter)             | Sigma-Aldrich, München                              |
| RNA-Standardkontrolle LV 87-012           | Dr. Dr. B. Niklasson (Apodemus AB,<br>Stockholm, S) |
| 18-S-/28-S-rRNA Marker                    | Sigma-Aldrich, München                              |

#### 2.1.1.5 Plasmide

|  |                       |
|--|-----------------------|
| hu $\beta$ -Aktin Standard Plasmid       | Genexpress, Berlin    |
| hu GAPDH Standard Plasmid                | Genexpress, Berlin    |
| hu RPII Standard Plasmid                 | Genexpress, Berlin    |
| pPVB19-CR2.1T                            | Genexpress, Berlin    |
| TOPO® TA Cloning Vektor pcDNA3.1/ V5-His | Invitrogen, Karlsruhe |

#### 2.1.1.6 Oligonukleotide

|                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| BGHrev (5'-TAGAAgCACAgtTCgAgg-3') | Invitrogen, Karlsruhe                           |
| MGB®-Sonden für LV-Nachweis       | Applied Biosystems,<br>Warrington, Cheshire, UK |
| Random Primers                    | Invitrogen, Karlsruhe                           |
| T7 (5'-TAATACgACTCACTATAggg-3')   | Invitrogen, Karlsruhe                           |

Weitere Oligonukleotide wurden über die Firma Tib Molbiol, Berlin bezogen. Falls sie hier im folgenden nicht aufgezählt sind, sind sie in den entsprechenden Protokollen aufgelistet:

Für den human  $\beta$ -Aktin-Nachweis:

|        |                                    |                              |
|--------|------------------------------------|------------------------------|
| ACT s  | 5'-AgCCTCgCCTTTgCCgA-3'            | GenBank Accession No. M10277 |
| ACT as | 5'-CTggTgCCTggggCg-3'              |                              |
| ACT TM | <b>F-CCgCCgCCCgTCCACACCCgCCT-p</b> |                              |

Für den human GAPDH-Nachweis:

|          |                                  |                              |
|----------|----------------------------------|------------------------------|
| GAPDH s  | 5'-gAAGgTgAAggTCggAgTC-3'        | GenBank Accession No. J02642 |
| GAPDH as | 5'-gAAgATggTgATgggATTTC-3'       |                              |
| GAPDH TM | <b>F-CAAgCTTCCCgTTCTCAgCCT-p</b> |                              |

Für den human RPII-Nachweis:

|         |   |                              |
|---------|---|------------------------------|
| RPII s  | 5'-gCACCACGTCCAATgACAT-3'                 | GenBank Accession No. X74870 |
| RPII as | 5'-gTgCggCTgCTTCCATAA-3'                  |                              |
| RPII TM | <b>F-TACCACgTCATCTCCTTTgATggCTCCTAT-p</b> |                              |

### 2.1.1.7 Antikörper

Anti-LV-Primärantikörper:

Maus-Anti-87-012; Maus-Anti-174F; Maus-Anti-145SL;

Alle hier aufgeführten Primärantikörper stammen aus dem Swedish Institute for Infectious Disease Control (SMI), Stockholm, Schweden, und wurden freundlicherweise von Hr. Dr. Dr. B. Niklasson zur Verfügung gestellt.

Sekundärantikörper:

|                                       |   |
|---------------------------------------|---|
| Ziege anti-Maus-IgG (FITC-konjugiert) | Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA<br>(Bestellnummer: A90-216F) |
|---------------------------------------|---|

### 2.1.1.8 Reagenziensätze (Kits)

|  |  |
|--|--|
| ABI PRISM® Big Dye® Terminator 3.1 Kit   | Applied Biosystems, Warrington, Cheshire, UK |
| BAG-Adeno-EIA IgG/IgM                    | BAG, Lich                                    |
| Enterovirus ELISA IgG/IgM                | Genzyme Virotech, Rüsselsheim                |
| HighPure® RNA Tissue Kit                 | Boehringer-Mannheim, Mannheim                |
| NucleoSpin® Tissue Kit                   | Macherey-Nagel, Düren                        |
| pcDNA3.1/ V5-His TOPO® TA Expression Kit | Invitrogen, Karlsruhe                        |
| peqGOLD RNAPure®                         | Peqlab, Erlangen                             |
| PicoGreen® dsDNA Quantitation Kit        | Molecular Probes, Leiden, NL                 |
| QIAamp® DNA Blood Kit                    | Qiagen, Hilden                               |
| QIAamp® DNA Kit                          | Qiagen, Hilden                               |

|  |                                      |
|--|--------------------------------------|
| QIAamp® Viral RNA Kit                  | Qiagen, Hilden                       |
| QIAGEN® Plasmid Mini Kit               | Qiagen, Hilden                       |
| QIAquick® Gel-Extraction Kit           | Qiagen, Hilden                       |
| recomWell Parvovirus B19 IgG/IgM       | Mikrogen, Martinsried                |
| RNAzol® B                              | Cinna/Tel-Test, Friendswood, TX, USA |
| RNeasy® Protect                        | Qiagen, Hilden                       |
| Total Quick® RNA Cells and Tissues Kit | Talent, Trieste, I                   |

### 2.1.1.9 Kunststoffartikel

|   |   |
|---|---|
| Deckelchen für TaqMan®-Platten; 8er-Streifen                          | ABgene, Epsom, Surrey, UK   |
| Einwegküvetten  | Eppendorf, Hamburg  |
| Kryoboxen mit Gittersystem  | Merck Eurolab, Darmstadt  |
| Kryogefäße; 1,8 ml mit Innengewinde                                   | Nunc, Wiesbaden   |
| Lochplatten (24er, 96er)  | Nunc, Wiesbaden   |
| Mikrotiterplatten; 96er (NU-96F, schwarz)                             | Nunc, Wiesbaden   |
| Objektträger mit 8er-Lochkammern                                      | Nunc, Wiesbaden   |
| PCR-Pipettenspitzen mit Aerosolschutz<br>(1, 10, 100, 1000 µl)        | Biozym, Oldendorf/ Eppendorf, Hamburg/<br>Molecular Bioproducts, San Diego, CA, USA |
| PCR-Pipettenspitzen ohne Aerosolschutz<br>(10, 100, 1000 µl)          | Süd Laborbedarf, Gauting  |
| PCR-Platten; 96er; 0,2 ml (für TaqMan®)                               | ABgene, Epsom, Surrey, UK   |
| PCR-Reaktionsgefäße:  |   |
| • 0,2; 0,5 ml   | Biozym, Oldendorf/ Eppendorf, Hamburg/<br>Nunc, Wiesbaden                           |
| • 0,2 ml; 8er-Streifen mit Deckel                                     | Biozym, Oldendorf   |
| Petrischalen  | Greiner, Frickenhausen  |
| Reaktionsgefäße:  |   |
| • 0,5; 1,5; 2,0 ml  | Eppendorf, Hamburg  |
| • 15, 50 ml   | Nunc, Wiesbaden   |
| Seropipetten<br>(1, 5, 10, 25, 50 ml)                                 | Nunc, Wiesbaden   |
| Zellkulturflaschen mit Filterdeckel<br>(25, 75, 175 cm <sup>3</sup> ) | Nunc, Wiesbaden   |

### Zentrifugengefäße:

14x95 mm PA (Polyallomer)

Beckman Coulter, Krefeld

12x75 mm PP (Polypropylen)

Greiner, Frickenhausen

### 2.1.1.10 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen

Roth, Karlsruhe

### Eindeckmedien:

Dako<sup>®</sup> Fluorescent Mounting Medium

Dako Diagnostics, Carpinteria, CA, USA

Vectashield<sup>®</sup> Hard+Set<sup>®</sup> Mounting Medium

Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

Einwegskalpelle

B. Braun Aesculap, Tuttlingen

Einwegspritzen

B. Braun, Melsungen

Filterpapier

Whatman, Brentford, Middlesex, UK

Fotopapier Brovira BN; Gradation 1-5

Agfa-Gevaert, Leverkusen

Gelatinekapseln; 200 ml Volumen

Hert, München

Glasplättchen; 15 mm Durchmesser

Roth, Karlsruhe

Parafilm

American National Can, Greenwich, CT, USA

Plattenwachs

Heko Werk, Berlin

Polaroidfilm 667

Polaroid, Offenbach

Refinal

Agfa-Gevaert, Leverkusen

Scientia Planfilm 23DP3AH

Agfa-Gevaert, Leverkusen

Schweißfolien für TaqMan<sup>®</sup>-Platten

ABgene, Epsom, Surrey, UK

Spatel (diverse)

Roth, Karlsruhe

### 2.1.1.11 Spezielle Softwares

BioEdit

North Carolina State University, USA

([www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html](http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html) - 11k)

BLAST 2.2.9

NCBI, Bethesda, MD, USA

([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/))

cLSM510 Software, Version 3.0, SP3

Zeiss, Jena

EpiInfo6 Version 6.04d

CDC, Atlanta, GA, USA

([www.cdc.gov/epiinfo/Epi6/ei6.htm](http://www.cdc.gov/epiinfo/Epi6/ei6.htm))

PrimerSelect<sup>®</sup>

DNASStar Inc., Madison, WI, USA

GeneAmp® 5700 SDS Software Applied Biosystems, Foster City, CA, USA  
SDS 1.9.1 (für Typ 7700)  
SDS 2.1 (für Typ 7900 HT)

SeqMan® II DNASTar Inc., Madison, WI, USA

## **2.1.2 Puffer- und Gebrauchslösungen**

Wenn in dieser Liste nicht aufgeführt, sind die Zusammensetzungen der Lösungen bei den entsprechenden Protokollen zu finden.

Für die RNA-Extraktion nach Chirgwin et al. (1979):

|   |   |
|---|---|
| 3 M Natriumacetat-Stammlösung                         | - 49,22 g auf 200 ml DEPC-Wasser<br>- pH 6,0 mit Essigsäure (p.A.) einstellen<br>- autoklavieren  |
| 250 mM EDTA-Stammlösung<br>(Ethylendiamintetraacetat) | - 18,61 g auf 200 ml DEPC-Wasser<br>- 5 bis 6 NaOH-Plätzchen<br>- pH 6,5 mit 1 M NaOH einstellen<br>- autoklavieren   |
| GTC-Lösung (400 ml)                                   | - 4 M GTC<br>- 1 % (w/v) Sarcosyl (N-Lauroylsarcosin)<br>- 25 mM Natriumacetat; pH 6,0<br>- 1 mM EDTA; pH 6,5<br>- 1 M $\beta$ -Mercaptoethanol (ME)<br>- Lösung in sterilem aq. dest. ansetzen, auf 372 ml auffüllen<br>- dazu 28 ml ME erst unmittelbar vor der RNA-Präparation (unterm Abzug!) geben |
| CsCl-Kissen   | - 5,7 M CsCl<br>- 100 mM EDTA; pH 6,5<br>- in DEPC-Wasser ansetzen und sterilfiltrieren<br>- 6 mM ME hinzufügen (unterm Abzug!)   |
| TSPE-Puffer   | - 10 mM Tris-HCl; pH 7,0<br>- 1 % (w/v) Sarcosyl (N-Lauroylsarcosin)<br>- 5 % (v/v) Phenol  |

- 1 mM EDTA; pH 6,5
- auf 10 ml mit DEPC-Wasser auffüllen und sterilfiltrieren

### Für die quantitative PCR:

2,5 mM dNUTP-Stammlösung

- je 250 µl 100 mM Nukleotid-triphosphatlösung (A, C, G, U)
- ad 10 ml Molekularwasser

10x Taq-Puffer+ROX

- 150 µl ROX auf 1350 µl 10x Taq-Puffer

### Für die Gelelektrophorese:

Gel-Beladungspuffer (10 ml)

- 40 mg Bromphenolblau
- 5 ml Glycin
- gelöst in 5 ml 1x TAE

### Für die Zellkultur:

Diluent-Lösung (1 L)

- 8 g NaCl
- 0,4 g KCl
- 0,06 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 0,06 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 1 g Glucose
- 0,375 g NaHCO<sub>3</sub>
- auf pH 7,0 einstellen
- Zugabe von 0,2 % (v/v) Versen

Freeze-Mix (Einfriermedium)

- 90 % (v/v) FKS
- 10 % (v/v) DMSO (Dimethylsulfoxid)

### Für den Immunfluoreszenztest:

PBS-Puffer

- 140 mM NaCl
- 2 mM KCl
- 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Blockpuffer

- 10 ml PBS
- 3 % (v/v) FKS
- 0,1 % (v/v) Tween 20



- RPMI 1640 oder DMEM-Nährlösungen für Zellkultur werden jeweils komplettiert mit
- 10 % (v/v) FKS
  - 1 % (v/v) L-Glutamin (200 mM)
  - 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin-Lösung (10000 U)
  - 2 % (v/v) nicht-essentielle Aminosäuren (nur bei DMEM)

### 2.1.4 Zelllinien, Bakterien- und Virenstämme

#### Zelllinien:

| <u>Zelllinie</u> | <u>Spezies/Zellart</u>          | <u>Herkunft</u>                                 |
|------------------|---------------------------------|---|
| Vero-B4          | Affennierenzellen               | Stammsammlung ZBS-1, RKI                        |
| BHK-21           | Hamsternierenzellen             | Stammsammlung ZBS-1, RKI                        |
| 3T3              | murine Fibroblasten             | Hr. Dr. A. Zimmermann, FG12, RKI                |
| Mv 1 Lu          | murine Lungenepithelzellen      | Hr. Dr. J. Denner, P13, RKI                     |
| CHO              | Hamster, Ovariene epithelzellen | Fr. Prof. Dr. Schürmann-Bartsch, DIfE, Nuthetal |
| LTK              | murine Fibroblasten             | Fr. Prof. Dr. Schürmann-Bartsch, DIfE, Nuthetal |

#### Bakterien:

*Escherichia coli* Top10

F<sup>-</sup> *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80/*lacZ*ΔM15  
 Δ*lacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU*  
*galK rpsL* (Str<sup>R</sup>) *endA1 nupG* (Invitrogen)

#### Viren:

Alle hier aufgeführten LV-Isolate stammen aus dem Swedish Institute for Infectious Disease Control (SMI), Stockholm, Schweden, und wurden freundlicherweise von Hr. Dr. Dr. B. Niklasson zur Verfügung gestellt. Die Virusisolate wurden zuvor in Affennierenzell- oder Jungmäusehirn (SMB, *suckling mouse brain*)-Kulturen adaptiert:

LV 87-012; LV 174F; LV 145SL; LV 342SL; M-1146; NY64-7855; NY64-7947.

## 2.2 Methoden

Zwischen April 2001 und April 2004 wurden in der Klinik für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie des Deutschen Herzzentrums Berlin (DHZB; AG Prof. Meyer, Herzpathologie/Homograftbank) Myokardproben aus explantierten Herzen von Herztransplantatempfängern (HTx-Patienten) und Herzspendern (Donor-Patienten) gesammelt. Alle Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme bei -20 °C tief gefroren und später bis zu ihrer weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff im Robert Koch-Institut (RKI) gelagert. Nach der Isolierung von Nukleinsäuren (DNA bzw. RNA) aus dem jeweiligen Herzmuskelgewebe mittels geeigneter Präparationstechniken, wurden alle Proben mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) auf das Vorhandensein von Enteroviren (EV), Adenoviren (ADV), humanem Zytomegalievirus (HCMV), Parvovirus B19 (PVB19) und Influenzavirus (Typ A und B) untersucht. Darüber hinaus fanden PCR-Untersuchungen bezüglich der Präsenz der bisher in diesem Zusammenhang wenig untersuchten Hantaviren (*Bunyaviridae*) und Ljunganviren (*Picornaviridae*) statt. Die Nachweisuntersuchungen wurden retrospektiv und ohne Kenntnis der Krankengeschichte der jeweiligen Patienten in verschiedenen Laboratorien durchgeführt: Am RKI für EV, PVB19, Influenzavirus, Hanta- und Ljunganviren (LV) und in Kooperation mit Fr. Dr. S. Prösch (Institut für Virologie, Charité, Berlin) für ADV und HCMV. Zusätzlich wurden in der Homograftbank des DHZB Schnitte von Myokardproben in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet, um sie für ausgewählte Bestätigungsuntersuchungen mittels *in situ* Hybridisierung (ISH) aufzubewahren. Die ISH-Untersuchungen fanden in Zusammenarbeit mit der AG Prof. Kandolf (Molekulare Pathologie) im Institut für Pathologie der Universität Tübingen statt. Alle Herzexplantate wurden routinemäßig im DHZB einer histopathologischen Untersuchung und Bewertung unterzogen. Falls vorhanden, wurden Patientenserum auf spezifische Antikörper gegen EV, ADV und PVB19 im RKI getestet, da bezüglich dieser kardiotropen Viren keine Angaben zur Serologie in den Patientendaten gemacht worden sind.

Des Weiteren wurden in Kooperation mit Hr. Dr. Dr. B. Niklasson (Apodemus AB, Stockholm, Schweden) mittels LV-Isolaten erste Studien zur Morphologie und zum Infektionsverlauf (*in vitro*) von Ljunganviren durchgeführt. Als Techniken kamen hier

zum Einsatz: Virusanzucht in Zellkulturen, TCID<sub>50</sub>-Titerbestimmung, indirekter Immunfluoreszenztest (IFT) und Elektronenmikroskopie. Zwei PCR-Methoden zum LV-Nachweis wurden im Rahmen dieser Arbeit am RKI etabliert, um damit Untersuchungen in verschiedenen Gewebe- und Liquorproben durchführen zu können.

Falls in den nachfolgenden Methodenbeschreibungen nicht näher erläutert, finden sich weitere Angaben zu den verwendeten Materialien, Geräten, Puffer- und Nährlösungen in der Materialliste [siehe Kap. 2.1].

### 2.2.1 Probenentnahme, Patientenauswahl und Patientendaten

Untersucht wurden chirurgische Schnitte von Myokardproben mit einer Kantenlänge von ca. 1 cm, die aus explantierten Herzen in Standardpositionen entnommen worden sind (Abb. 7): Linker Ventrikel Vorderwand (LVVW), Linker Ventrikel Hinterwand (LVHW), Septum, Vorderwand des rechten Ventrikels (RV). Die Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme bei -20 °C tief gefroren und bis zu ihrer weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Probenentnahme fand nach einem zusammen mit dem Homograflabor des DHZB ausgearbeiteten Standardprotokoll statt. Außerdem wurden, wenn möglich, parallel Patientenserum für serologische Untersuchungen gesammelt und bei -20 °C gelagert.



**Abbildung 7:**  
**Entnahme von**  
**Myokardproben im**  
**Homograflabor.**

Die Herzexplantate stammen entweder von HTx-Patienten, die sich in dem oben genannten Zeitraum aufgrund der klinischen Diagnose Herzinsuffizienz einer Herztransplantation unterzogen haben, oder

von Herzspendern, deren Herzen aufgrund einer Kontraindikation (z.B. dokumen-

tierter Herzinfarkt), eines nativen Fehlers oder eines chirurgischen Fehlers während der Herzentnahme für eine Allograftspende abgelehnt wurden. Patienten mit einem dokumentierten serologisch positiven Befund für HIV, Hepatitis B- und/oder Hepatitis C-Virus wurden von vornherein durch das Homograftlabor für diese Studie ausgeschlossen, da Patienten mit solchen Infektionen als Donor im weitesten Sinne (z.B. für Herzklappengewebe) nicht in Frage kommen.

Zur Bewertung der erhobenen virologischen Daten wurden, neben den Befundberichten über den morphologischen Zustand des Myokards, der Koronararterien, der Aorta und der Arteria pulmonalis von den Herzen, die der Homograftbank in dem oben genannten Zeitraum für die Klappengewinnung zur Verfügung standen, wenn möglich, weitere Quellen herangezogen, um Angaben zur Krankengeschichte zu erhalten. Im Fall der HTx-Patienten wurden i.d.R. die im EDV-System des DHZB gespeicherten Arztbriefe nach der kardialen Diagnose, die von den klinisch tätigen Ärzten gestellt worden war, und nach anderen wesentlichen Erkrankungen gesichtet. Im Fall der hirntoten Spender erfolgte i.d.R. eine Durchsicht der Spenderinformationsprotokolle in der Kartei der Homograftbank nach der Todesursache, nach dem Grund für die Ablehnung des Organs für die Spende und nach wesentlichen Vorerkrankungen.

### **2.2.2 Präparation und Reinigung von Nukleinsäuren aus Myokardgewebe**

Für den Nachweis von Nukleinsäuren (DNA oder RNA) mittels PCR [Kap. 2.2.4] müssen die zu amplifizierenden Nukleinsäure-Moleküle vorab aus dem Gewebe gewonnen und von anderen zellulären Komponenten befreit werden, die möglicherweise die Amplifikationsreaktion im Anschluss inhibieren könnten (Wiedbrauk et al., 1995). Dies stellt hohe Anforderungen an ein Extraktions- bzw. Präparationsverfahren von Nukleinsäuren aus Geweben hinsichtlich der Quantität und auch der Qualität der extrahierten Nukleinsäuren. Konventionell werden die Phenol-Chloroform-Extraktion für DNA (Sambrook et al., 1989) oder die Guanidinisothiocyanat-Methode für RNA (Chomczynski und Sacchi, 1987) mit einer anschließenden Ethanol-fällung angewendet, um Nukleinsäuren aus Zellen und Mikroorganismen zu gewinnen. In diagnostischen Laboren wird aus Zeitgründen immer weniger von diesen konven-

tionellen Methoden Gebrauch gemacht. Kommerzielle Reagenziensätze (Kits) sind im Vergleich hierzu gebrauchsfertig, einfach und schnell anzuwenden.

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche kommerzielle Extraktions-Kits gegenüber den jeweiligen konventionellen Methoden getestet, um die jeweils optimalen Extraktionsmethoden für DNA oder RNA aus Myokardgewebe bestimmen zu können.

### 2.2.2.1 Evaluation kommerzieller DNA-Extraktionsmethoden

Folgende kommerzielle DNA-Extraktionsmethoden wurden für die Isolierung und Aufreinigung der genomischen DNA aus Myokardgewebe gegenüber der konventionellen Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode, modifiziert nach Sambrook et al. (1989) [Kap.2.2.2.4], evaluiert: QIAamp<sup>®</sup> DNA Kit (Qiagen) und NucleoSpin<sup>®</sup> Tissue Kit (Macherey-Nagel).

DNA wurde aus je 50 mg tiefgefrorenem Myokardgewebe eines Testexplantats im Doppelansatz extrahiert (n= 6). Für die kommerziellen Kits wurden alle zuvor homogenisierten Gewebeproben mit Proteinase K bei 56 °C lysiert und die DNA anschließend selektiv an eine Minisäule gebunden und später eluiert. Verbliebene RNA-Reste wurden durch einen zusätzlichen Inkubationsschritt mit RNase A beseitigt. Die einzelnen Arbeitsschritte wurden nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Die benötigten Puffer und Verbrauchsmaterialien waren in den jeweiligen Kits enthalten.

### 2.2.2.2 Evaluation kommerzieller RNA-Extraktionsmethoden

Folgende kommerzielle RNA-Extraktionsmethoden wurden für die Isolierung und Aufreinigung der Gesamt-RNA aus Myokardgewebe gegenüber der Guanidinisothiocyanat-Methode von Chirgwin et al. (1979) [Kap. 2.2.2.4] evaluiert: RNAzol<sup>®</sup> B (Cinna/Tel-Test), peqGOLD RNAPure<sup>®</sup> (Peqlab), RNeasy<sup>®</sup> Protect (Qiagen), HighPure<sup>®</sup> RNA Tissue Kit (Boehringer Mannheim) und Total Quick<sup>®</sup> RNA Cells and Tissues Kit (Talent).

RNA wurde aus je 50 mg bzw. 25 mg (gemäß HighPure<sup>®</sup>-Protokoll) tiefgefrorenem Myokardgewebe eines Testexplantats im Doppelansatz extrahiert (n= 12). Alle gefrorenen Gewebeproben wurden zuvor mit Hilfe eines Hammers pulverisiert und anschließend mit einem Rotor-Stator-Homogenisator in Guanidinisothiocyanat-haltiger Lösung homogenisiert. Das chaotrope Agens führt zur Denaturierung und Inaktivierung endogener RNasen (Chirgwin et al., 1979; Chomczynski und Sacchi, 1987). Die einzelnen Arbeitsschritte wurden nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Die benötigten Puffer und Verbrauchsmaterialien waren in den jeweiligen Kits enthalten.

#### 2.2.2.3 Parameter zur Evaluation der eingesetzten Extraktionsmethoden

Folgende Parameter wurden für die Evaluation der Methoden getestet:

1. Konzentration und Ausbeute der jeweils extrahierten Nukleinsäuren.
2. Reinheitsgrad der extrahierten Nukleinsäuren mittels der  $OD_{260}/OD_{280}$ -Ratio.
3. DNA-Gehalt der RNA-Präparate mittels fluorometrischer Quantifizierung.
4. Intensität der RNA-Banden im 1 %-igen Agarosegel.

Die Bestimmung der Konzentration, Ausbeute und des Reinheitsgrads der Nukleinsäuren erfolgte photometrisch [Kap. 2.2.3]. Die Bestimmung des DNA-Gehalts erfolgte fluorometrisch [Kap. 2.2.3]. Die Qualität der extrahierten RNA wurde mittels gelelektrophoretischer Auftrennung anhand der 28-S- und 18-S-rRNA-Banden überprüft [Kap. 2.2.5].

#### 2.2.2.4 Aufarbeitung der Myokardproben

Für die Extraktion der Nukleinsäuren aus Myokardgewebe in dieser Arbeit wurden die konventionellen Methoden nach Chirgwin et al. (1979) für RNA und (modifiziert) nach Sambrook et al. (1989) für DNA angewendet.

Bei der RNA-Extraktion nach Chirgwin et al. (1979) wird Gesamt-RNA aus einem Guanidinisothiocyanat-Lysat mittels Ultrazentrifugation (UZF) durch ein Cäsiumchlorid (CsCl)-Kissen gewonnen. Der zusätzliche UZF-Schritt erlaubt es gleichzeitig RNA und DNA aus einer Probe sauber voneinander getrennt zu isolieren, indem für die DNA-Isolierung der Überstand abgezogen und anschließend mit der modifizierten Methode nach Sambrook et al. (1989) weiterverarbeitet wird.

### Probenaufarbeitung:

**Tag 1** – Die in flüssigem Stickstoff eingefrorene Gewebeprobe wurde zügig gewogen. Das Gewicht der Probe durfte 1/10 des Volumens der Guanidinisothiocyanat (GTC)-Lösung pro Zentrifugenröhrchen nicht überschreiten. Der Probenaufschluss erfolgte mittels mechanischer Disruption durch einen Hammer (*freeze-fracturing*) und anschließender Homogenisierung („Rotor-Stator-Homogenisation“) in proteindenaturierender,  $\beta$ -Mercaptoethanolhaltiger GTC-Lösung.  $\beta$ -Mercaptoethanol bricht zusätzlich die stabilen Disulfidbrücken in Proteinen auf. Zur Vermeidung von Kreuz-Kontaminationen zwischen den einzelnen Probenaufschlüssen wurde ein Protokoll nach Schowengerdt et al. (1996) angewendet [Kap. 2.2.2.5]. Nach Zentrifugation (3000 UpM, 10 min, RT) in einer Heraeus Megafuge 1.0 R wurde das Probenlysat in ein Polyallomer (PA)-Zentrifugenröhrchen (Beckman) auf ein vorgelegtes CsCl-Kissen vorsichtig geschichtet, mit GTC-Stammlösung aufgefüllt und austariert. Danach erfolgte die UZF (33000 UpM, 21 h, 22 °C), wobei der verwendete SW40-Rotor ohne Bremsung später auslief. Bei CsCl muss unbedingt bei RT zentrifugiert werden, da es sonst bei niedrigen Temperaturen leicht ausfällt, was angesichts der hohen Zentrifugationsgeschwindigkeit zu Unfällen mit der Ultrazentrifuge führen kann.

**Tag 2** – Der Überstand wurde bis ca. 1 cm vom Boden des Zentrifugenröhrchens abgenommen und für die DNA-Extraktion aufbewahrt. Der untere Teil des PA-Zentrifugenröhrchens wurde mit einem Skalpell abgeschnitten und auf Eis gehalten. Das Pellet wurde zweimal mit phenolhaltigem TSPE-Puffer gelöst und anschließend in ein Polypropylen (PP)-Zentrifugenröhrchen (Greiner) überführt. Dazu wurden 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat und 10 ml Ethanol (reinst) gegeben. Danach erfolgte die Ethanol-fällung zur Aufkonzentrierung und Entsalzung der RNA über Nacht bei -20 °C.

Der aufbewahrte Überstand wurde zur Entfernung von Proteinen mit dem gleichen Volumen Phenol versetzt und vorsichtig gemischt. Danach erfolgte die Zentrifugation (5000 UpM, 5 min, RT) mit einer Heraeus Megafuge 1.0 R zur Trennung der organischen und wässrigen Phase. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß

überführt. Danach wurde das gleiche Volumen Phenol-Chloroform (1:1-Gemisch) dazugegeben und erneut vorsichtig gemischt und zentrifugiert. Die verbliebenen Interphase und organische Phase wurden ebenfalls re-extrahiert. Um Phenol-Reste zu entfernen, wurde die wässrige Lösung mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1-Gemisch) versetzt und erneut zentrifugiert. Zur Aufkonzentrierung und Entsalzung der DNA wurde der wässrigen Lösung 2,5 Volumen Ethanol-Natriumacetat (1:1-Gemisch) dazugegeben und über Nacht bei 4 °C gefällt.

**Tag 3** – Das RNA-Präzipitat wurde in einer Kühlzentrifuge (Sorvall-Kendro) mit einem HB-6-Rotor abzentrifugiert (10000 UpM, 60 min, -10 °C). Der Überstand wurde abdekantiert und das Pellet anschließend kurz an der Luft getrocknet und danach wieder auf Eis gehalten. Das Pellet wurde zweimal mit DEPC-haltigem Wasser gelöst und anschließend in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Dazu wurden 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat und 2,5 Volumen Ethanol (reinst) gegeben. Danach erfolgte die Ethanolfällung zur Aufkonzentrierung der RNA über Nacht bei -20 °C.

Das DNA-Präzipitat wurde ebenfalls vorab in einer Kühlzentrifuge (Sorvall-Kendro) mit einem HB-6-Rotor abzentrifugiert (10000 UpM, 60 min, -10 °C). Der Überstand wurde abdekantiert und das Pellet mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und anschließend in einer Speed-vac vakuumgetrocknet. Das getrocknete DNA-Pellet wurde in 100 µl Molekularwasser aufgenommen, resuspendiert und bis zu seiner weiteren Verwendung bei -80 °C bzw. in flüssigem Stickstoff gelagert.

**Tag 4** – Das RNA-Präzipitat wurde in einer Kühlzentrifuge (B. Braun) mit einem 12145 Rotor abzentrifugiert (14000 UpM, 60 min, -10°C). Der Überstand wurde zügig abdekantiert und das Pellet zweimal mit 70 %-igem Ethanol gewaschen (jeweils 15 min abzentrifugiert). Das Pellet wurde mit einer Speed-vac vakuumgetrocknet und anschließend in 100 µl Molekularwasser aufgenommen, resuspendiert und bis zu seiner weiteren Verwendung bei -80 °C bzw. in flüssigem Stickstoff gelagert.

### 2.2.2.5 Vermeidung von Kreuz-Kontaminationen beim Probenaufschluss

Um Kreuz-Kontaminationen durch Übertragung von Nukleinsäuren zwischen den einzelnen Probenaufschlüssen zu vermeiden, wurde folgendes Protokoll nach Schowengerdt et al. (1996) angewendet:

Das Dispergierwerkzeug wurde eine Minute lang mit DEPC-Wasser gewaschen, danach mit 1 %-igem SDS für 10 min und anschließend mit Ethanol (reinst) erneut für 10 min. DEPC und SDS besitzen zudem eine RNase-inhibierende bzw. -denaturierende Wirkung. Alle Waschschrte wurden bei mittlerer Geschwindigkeit des Homogenisators durchgeführt. Das Dispergierwerkzeug wurde nach jedem Arbeitstag 20 min autoklaviert und vor seiner Wiederverwendung auf RT abgekühlt.

### 2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Eine grundlegende molekularbiologische Technik ist die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren. Sie bildet mitunter die Voraussetzung dafür, dass in der PCR stets ausreichende Mengen an Nukleinsäuren eingesetzt werden können. Neben der Konzentrationsbestimmung mittels Agarosegel [Kap. 2.2.5] gibt es die Absorptionsspektrometrie und die fluorometrische Bestimmung, die im Folgenden kurz erläutert werden.

#### 2.2.3.1 Absorptionsspektrometrie

Die Konzentration einer wässrigen Nukleinsäurelösung kann über die Absorption bei 260 nm ( $OD_{260}$ ) photometrisch bestimmt werden. Allerdings sind hierzu recht große Mengen an DNA bzw. RNA notwendig, da ein Photometer nur in einem Bereich von 0,05 und 1  $OD_{260}$  zuverlässig misst. Das entspricht einer Nukleinsäuremenge von 2,5 bis 50  $\mu\text{g}$  je ml. Durch kleinere Arbeitsvolumina und Verdünnungen kann man die Menge allerdings reduzieren. Die Messung erfolgte mittels eines Bio-Photometers (Eppendorf) in einer Einwegküvette mit einem Arbeitsvolumen von 100  $\mu\text{l}$  (jeweils 1:20 verdünnt). Parallel wurde die Absorption bei 280 nm ( $OD_{280}$ ) bestimmt, um über den Quotienten  $OD_{260}/OD_{280}$  eine Aussage über den Reinheitsgrad der Nukleinsäurepräparation zu erhalten. Der Quotient sollte einen Wert zwischen 1,8 und 2,0 ergeben. Für die Konzentration von wässrigen Nukleinsäurelösungen gilt folgender Zusammenhang (Sambrook et al., 1989):

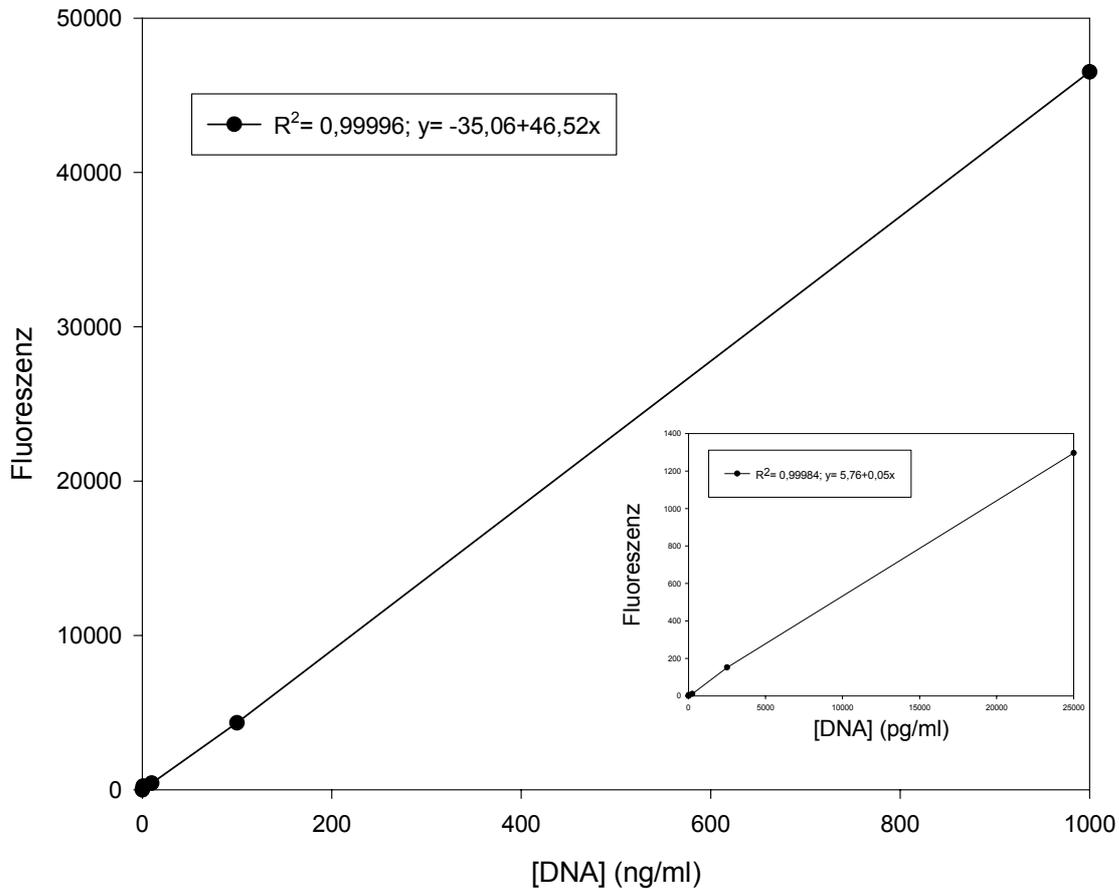
|                             |   |
|-----------------------------|---|
| RNA-Lösung:                 | 1 OD <sub>260</sub> /ml entspricht 40 µg/ml |
| doppelsträngige DNA-Lösung: | 1 OD <sub>260</sub> /ml entspricht 50 µg/ml |
| einzelsträngige DNA-Lösung: | 1 OD <sub>260</sub> /ml entspricht 33 µg/ml |

### 2.2.3.2 Fluorometrische Bestimmung

Für eine spezifische und quantitative Bestimmung von DNA-Mengen erfolgte die Messung der Nukleinsäurekonzentration mittels eines Fluoreszenzfarbstoffes, PicoGreen® (Molecular Probes), in einem Mikrotiterplatten-Spektrofluorometer (Tecan). Durch selektive Bindung an doppelsträngige DNA ändert der Fluoreszenzfarbstoff seine sterische Konformation und emittiert nach Anregung Licht einer definierten Wellenlänge. Im Fluorometer können so DNA-Konzentrationen zwischen 25 pg/ml und 1000 ng/ml bestimmt werden. PicoGreen® hat gegenüber einem anderen, bekannteren Fluoreszenzfarbstoff (Hoechst 33258) eine Reihe wesentlicher Vorteile. So ist z.B. die Sensitivität des Reagens gegenüber Salzen, Detergenzien und anderen möglichen Verunreinigungen in Nukleinsäureproben beständig. Auch ist der Farbstoff mit nur einer einzigen angesetzten Konzentration wesentlich sensitiver und zeigt keine Signalverstärkung durch einzelsträngige DNA oder RNA.

Vor Beginn der Konzentrationsbestimmung von DNA-Proben wurde eine DNA-Standardkurve gemäß Herstellerangaben erstellt. Hierzu wurde Lambda-DNA-Standard in verschiedenen Konzentrationen verwendet. Die Messung erfolgte gemäß Herstellerangaben in einer schwarzen 96er-Mikrotiterplatte (Nunc) mit einem Arbeitsvolumen von 200 µl. Die Konzentration der jeweiligen DNA in den Proben konnte mit Hilfe der Standardkurve ermittelt werden. Abbildung 8 zeigt zwei Standardkurven für die Messung mit PicoGreen® in zwei verschiedenen Messbereichen: einen Messbereich für hohe DNA-Konzentrationen zwischen 1 ng/ml und 1 µg/ml und einen Messbereich für niedrige DNA-Konzentrationen zwischen 25 pg/ml und 25 ng/ml.

Die einzelnen Arbeitsschritte wurden nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Die benötigten Puffer sowie der DNA-Standard waren in dem Kit enthalten.



**Abbildung 8: Fünf-Punkte-Standardkurven für das PicoGreen® dsDNA Quantitation Reagens (Molecular Probes).** Gezeigt werden ein Messbereich für hohe DNA-Konzentrationen zwischen 1 ng/ml und 1 µg/ml (großes Diagramm) und ein Messbereich für niedrige DNA-Konzentrationen zwischen 25 pg/ml und 25 ng/ml (kleines Diagramm). Lambda-DNA-Standard in verschiedenen Konzentrationen wurde mit dem PicoGreen®-Reagens gemäß Herstellerangaben inkubiert. Alle Proben wurden bei 200 µl-Arbeitsvolumen in einer 96er-Mikrotiterplatte mittels eines Spektrofluorometers (Tecan) gemessen. Die Proben wurden mit Licht bei 485 nm angeregt und die Emission der Fluoreszenz bei 535 nm gemessen. Die Leerwert-korrigierten Daten wurden für die Erstellung der Standardkurven, Fluoreszenz versus DNA-Konzentration, verwendet.

## 2.2.4 Nachweis viraler Nukleinsäuren mittels DNA-Amplifikation über PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine sehr schnelle und sensitive Methode zur *in vitro*-Amplifizierung spezifischer DNA-Abschnitte und ermöglicht somit die De-

tektion kleinster DNA-Mengen. Durch die exponentielle Amplifikation der Zielsequenz ist es theoretisch möglich, noch Ausgangskonzentrationen von einem Genom-äquivalent (ge) im Untersuchungsgut nachzuweisen.

Technisch ist die PCR aufgrund ihrer hohen Detektionsempfindlichkeit anfällig für Kontaminationen. Bereits kleinste Mengen an Ziel-DNA können zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Da zudem die DNA ein relativ stabiles Biomolekül ist, können durch Fehler bei der Handhabung von PCR-Produkten ganze Arbeitsbereiche für die PCR-Diagnostik unbrauchbar gemacht werden. Derartige Fehler können durch einige konsequent einzuhaltende, präventive Maßnahmen (z.B. physikalische Trennung von PCR-Vorarbeiten und PCR-Produkten, UV-Dekontamination usw.) im Laborbereich vermieden werden (Kwok und Higuchi, 1989).

Das Prinzip der PCR-Reaktion basiert auf der enzymatisch katalysierten Vermehrung eines bestimmten DNA-Abschnittes, der zwischen zwei Startersequenzen, den sog. Primer-Oligonukleotiden, liegt (Mullis und Faloona, 1987). Die Basenabfolge der beiden Primer muss komplementär zu dem 3'- bzw. 5'-Ende der zu amplifizierenden DNA-Sequenz sein. Des Weiteren sollten die Primer eine Länge von 18 bis 30 Basen haben, einen G/C-Gehalt zwischen 40 bis 60 % sowie eine Schmelztemperatur ( $T_m$ ) zwischen 55 bis 80 °C. Daneben sollten bei der Primerauswahl Poly(T)-Bereiche, Haarnadelstrukturen und 3'-Komplementarität vermieden werden, da es sonst zu unspezifischen Bindungen oder Primerdimerbildung kommen könnte.

Der Einsatz einer hitzestabilen DNA-Polymerase, z.B. von *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase), erlaubt die zyklische Wiederholung der einzelnen Amplifikationsschritte innerhalb eines Ansatzes, wodurch die nachzuweisende Zielnukleinsäure exponentiell vermehrt wird (Newton und Graham, 1997). Die Entwicklung verschiedener einfacher Geräte für die Steuerung der PCR-Zyklen (sog. Thermozykler) ermöglichte die vollständige Automatisierung der PCR-Reaktion.

Binden die Primer an die komplementären DNA-Abschnitte, katalysiert die DNA-Polymerase die *in vitro*-DNA-Synthese, die im Wesentlichen in drei Schritten erfolgt: Jeder Zyklus besteht aus 1) einem Denaturierungsschritt bei 94 °C, um die beiden DNA-Stränge voneinander zu trennen, 2) einem Hybridisierungsschritt (*annealing*), in

dem die beiden Primer an den jeweils komplementären Strang binden, und 3) einem Syntheseschritt (*elongation*), währenddessen der zwischen den Primern liegende DNA-Abschnitt mithilfe der DNA-Polymerase und der im Reaktionsmix vorhandenen Desoxyribonukleotide selektiv synthetisiert wird. Während jedes PCR-Zyklus sollte sich demnach die Menge der spezifischen DNA-Abschnitte verdoppeln, die im nächsten Zyklus wiederum als Ausgangs-DNA (*template*) für die Amplifikationsreaktion dient. Theoretisch würde somit die Menge der Zielsequenz während der PCR-Reaktion exponentiell zunehmen. In der Praxis wird jedoch nur eine ca. 70 bis 80 %-ige Effizienz der PCR erreicht, da die Bedingungen für eine exponentielle Amplifizierung des Zielproduktes sowohl am Anfang wie auch am Ende der Reaktion nicht optimal sind. Eine typische PCR-Reaktion verläuft in den ersten Zyklen, bei denen die Templatemenge noch sehr gering ist, linear, steigt anschließend exponentiell an und erreicht in der letzten Phase der Reaktion ein Plateau, da die Enzymaktivität nach einer bestimmten Zeit nachlässt und auch die amplifizierten DNA-Abschnitte teilweise nicht mehr mit den Primern, sondern untereinander hybridisieren.

Aufgrund dieser PCR-Reaktionskinetik ist es schwierig, Aussagen über die Ausgangs-DNA-Mengen zu treffen. In vielen Fällen ist jedoch eine Quantifizierung der Ausgangstemplatemenge nötig, z.B. bei der Virusquantifizierung zur klinischen Beurteilung von persistierenden Infektionen oder Überprüfung von antiviralen Therapieversuchen. Dies führte zur Entwicklung von zahlreichen quantitativen Nukleinsäure-Amplifikationstechniken für den Erregernachweis, wie z.B. Endpunktverdünnung, Post-PCR-Hybridisierung oder kompetitive PCR mit internen Standards.

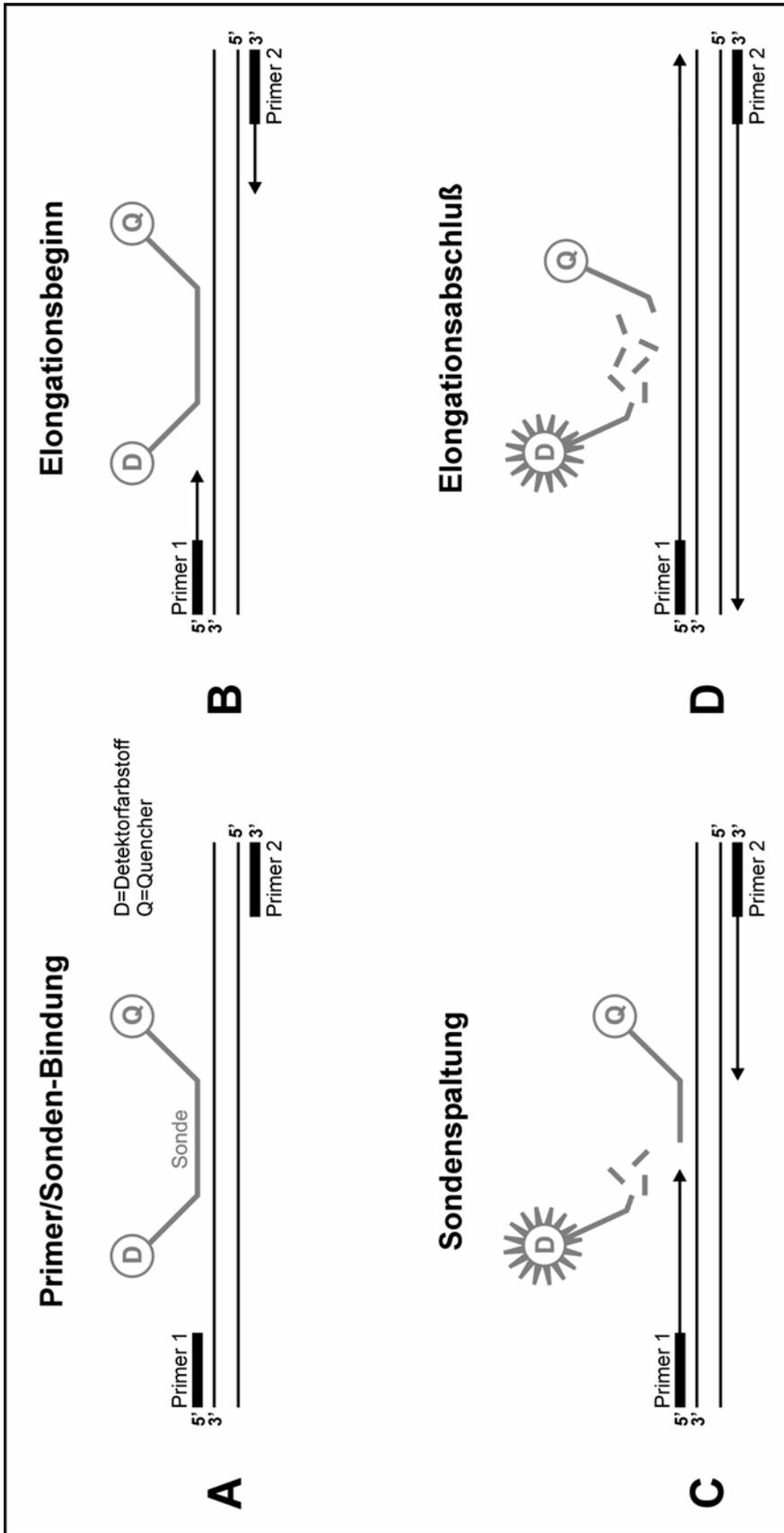
Die modernste Methode der Quantifizierung von Nukleinsäuren ist die quantitative Echtzeit-PCR (*real-time PCR*). Die Grundlage hierfür wurde durch Higuchi et al. (1992) geschaffen, die die PCR-Maschine mit einer UV-Lampe und CCD-Kamera ausstatteten und der PCR-Reaktion Ethidiumbromid zufügten. Das Ethidiumbromid interkaliert in doppelsträngiger DNA, wodurch die Fluoreszenz messbar erhöht wird. Die Methode wird heute, jedoch unter Verwendung anderer Farbstoffe, insbesondere des SYBR<sup>®</sup> Green I, angewandt. Der Vorteil der Methode liegt in der universalen Verwendbarkeit, weil damit jede beliebige PCR-Reaktion verfolgt werden kann, außerdem ist die Signalstärke hoch, weil jedes DNA-Molekül mehrere Farbstoff-

moleküle bindet. Der Nachteil liegt in der mangelnden Spezifität, weil nicht zwischen korrektem PCR-Produkt und Artefakten unterschieden werden kann.

Das Problem der mangelnden Spezifität wurde bereits mit dem von Holland et al. (1991) beschriebenen 5'-Nuklease-PCR-Assay unter Ausnutzung der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase gelöst. Allerdings erforderte diese Technik noch eine aufwendige Post-PCR-Prozessierung. So wurden radioaktiv markierte Sonden verwendet und Sondenfragmente von intakten Sonden mittels Dünnschichtchromatographie im Anschluss an die Reaktion unterschieden.

Die heute gängige Lösung baut dagegen auf der Ausnutzung des Fluoreszenz-(oder Förster) Resonanz-Energie-Transfers (FRET) auf, wie sie von Cardullo et al. (1988) eingeführt wurde. Aus der Kombination von PCR-Gerät mit Fluoreszenz-Detektion, spezifischem Oligonukleotid und FRET wurden drei verwandte Nachweismethoden entwickelt, genannt TaqMan<sup>®</sup>, *molecular beacons* und *hybridization probes* (Light-Cycler<sup>®</sup>-Verfahren).

Das TaqMan<sup>®</sup>-Prinzip (Abb. 9) ist das älteste und bekannteste von den Dreien. Bei dieser real-time PCR wird die Amplifikationsreaktion durch den Einsatz einer zusätzlichen fluoreszenzmarkierten Oligonukleotid-Sonde (*probe*) verfolgt und quantifiziert (Lee et al., 1993). Die TaqMan<sup>®</sup>-Sonde ist ein Oligonukleotid mit einem Detektionsfarbstoff (Reporter) am 5'-Ende (z.B. 6-Carboxy-Fluoreszein, FAM) und einem Quencherfarbstoff am 3'-Ende (z.B. 6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin, TAM-RA). Ihre Sequenz wird so gewählt, dass sie zeitlich vor den PCR-Primern zwischen deren Bindungsstellen auf der Zielsequenz bindet. Solange die Sonde intakt ist, wird bei Anregung des Detektionsfarbstoffes dessen Signal wegen der Nähe des Quenchers unterdrückt. Bei der Elongation der Primer zerlegt die Taq-Polymerase aufgrund ihrer 5'-3'-Exonukleaseaktivität die Sonde in ihre Einzelnukleotide und setzt den Reporter und Quencher frei. Nach der Freisetzung des Reporters kann dessen Signal detektiert werden (Livak et al., 1995). Aus dem Anstieg der freien Reporter-Konzentration ergibt sich ein wachsendes Fluoreszenzsignal, das proportional zur gebildeten Menge an PCR-Produkt ist.



**Abbildung 9: Reaktionsprinzip der TaqMan®-PCR (modifiziert nach Lottspeich und Zorbas, 1998).**

- A Primer und Sonde haben an die Zielsequenz gebunden, das Signal des Detektorfarbstoffs wird durch den Quencher inaktiviert
- B die Elongation der Primer hat begonnen
- C durch die 5'-Nucleaseaktivität der Taq DNA-Polymerase wird die Sonde während der Elongation abgebaut
- D Detektorfarbstoff und Quencher sind räumlich getrennt, das Fluoreszenzsignal kann detektiert werden

Die Quantifizierung der PCR basiert bei allen real-time-Systemen auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwerts, dem sog. *threshold cycle* ( $C_T$ -Wert). Der  $C_T$ -Wert ist jener PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Am Anfang der PCR-Reaktion wird nur die Basis- oder Hintergrundfluoreszenz gemessen, da die Reporterfluoreszenz aufgrund der geringen Templatekonzentration im Reaktionsgefäß während der ersten PCR-Zyklen nicht detektierbar ist.

Die Quantifizierung der DNA-Menge beruht nicht auf absoluten Mengen an PCR-Produkt, sondern auf der Kinetik der PCR-Reaktion. Dafür nimmt man den  $C_T$ -Wert, da zu diesem Zeitpunkt die Amplifikation exponentiell ist und es in dieser Phase der PCR-Reaktion keine limitierenden Faktoren wie Primer- oder Nukleotidmangel, nachlassende Enzymaktivität oder Inhibition der PCR-Reaktion durch Bildung bestimmter Produkte gibt. Parallel dazu oder vorher werden bekannte Templatemengen amplifiziert, so dass man vergleichen kann, welche Templatemenge man bei welchem  $C_T$ -Wert erhält. Daraus lässt sich eine Standardkurve erstellen, anhand derer man aus einem bestimmten  $C_T$ -Wert auf eine Templatekonzentration schließen kann.

Neben der Quantifizierung viraler DNA bieten real-time PCR-Verfahren gegenüber der konventionellen PCR weitere wichtige Vorteile für die Diagnostik: Als Echtzeitverfahren ermöglicht das TaqMan<sup>®</sup>-System die Analyse des Verlaufs der PCR-Reaktion bei der Auswertung, um mögliche Unregelmäßigkeiten zu untersuchen. Weitere Proben-Nachbearbeitungen wie z.B. Hybridisierung oder gelelektrophoretische Auftrennung sind i.d.R. entbehrlich, da am Ende der TaqMan<sup>®</sup>-PCR eine Aussage zur Konzentration der Zielnukleinsäuren steht. Damit wird auch das Kontaminationsrisiko durch potenziell freigesetzte PCR-Produkte eliminiert.

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche PCR-Verfahren (*assays*) zum Nachweis viraler Nukleinsäuren unterschiedlicher Erreger angewendet und damit die Gesamt-RNA bzw. -DNA aus Myokardgewebe untersucht. Für den Nachweis von Enteroviren wurde eine nested Reverse-Transkriptase-PCR (nRT-PCR) angewendet, deren Primer innerhalb der konservierten 5'-nicht-codierenden-Region (5' NCR) des Genoms hybridisieren, was einen gruppenspezifischen Nachweis verschiedener EV erlaubt (Pusch et al., 2005). Das Protokoll wurde freundlicherweise von Hr. Dr. E. Schreier

(NRZ für Polio- und Enteroviren, RKI) zur Verfügung gestellt. Die Präsenz von Influenzavirus Typ A und Typ B RNA wurde quantitativ mittels eines real-time RT-PCR-Verfahrens nach Schweiger et al. (2000) ermittelt. Die hierfür verwendeten Primer- und SONDENSEQUENZEN hybridisieren zum typenspezifischen Nachweis entweder in der M-Protein-Region oder in der HA-Protein-Region des Virusgenoms. Ebenso wurde auch auf die Präsenz von Hantaviren-RNA mittels eines real-time RT-PCR-Assays mit serotypspezifischen Primern und Sonden getestet, deren Sequenzen von Hr. Dr. M. Weidmann (Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Freiburg) freundlicherweise mitgeteilt wurden. Ein real-time RT-PCR-Verfahren zum gruppenspezifischen Nachweis von Ljunganviren wurde speziell für diese Arbeit entwickelt. Die Methode sowie ihre Etablierung werden gesondert im Kapitel 2.2.16 dargestellt.

Für die PCR von DNA-Viren wie Adenoviren oder HCMV wurden Primersequenzen verwendet, die bereits zuvor beschrieben wurden (Poddar, 1999; Olive et al., 1989). Der Nachweis dieser Viren fand in Kooperation mit Fr. Dr. S. Prösch (Institut für Virologie, Charité, Berlin) statt. Für den Nachweis von PVB19-DNA wurde in dieser Arbeit ebenfalls eine quantitative real-time PCR etabliert, was in Kapitel 2.2.4.7 erläutert wird. Die Präsenz von amplifizierbaren, zellulären Nukleinsäuren ( $\beta$ -Aktin, GAPDH, RNA-Polymerase II) aus dem Myokardgewebe wurde zur Kontrolle der Probenaufarbeitung mit Referenzgen-spezifischen Primern und Sonden nach Radonić et al. (2004) in einem quantitativen real-time PCR-Assay nachgewiesen. Für den Nachweis viraler Erreger in der PCR müssen das virale Genom oder zumindest wichtige Abschnitte seiner Sequenz bekannt sein. Nur dann können geeignete DNA-Bereiche für die PCR-Amplifikation ausgesucht und die entsprechenden spezifischen Primer für die Elongation synthetisiert werden. Die Temperaturbedingungen und Zykluszeiten müssen für jeden zu entwickelnden PCR-Assay neu ermittelt werden, das gilt auch hinsichtlich der Konzentration der einzelnen Primer und der Salzbedingungen für das Primerannealing und der Fehlerrate der DNA-Polymerase. Die Sequenzen der jeweiligen Primer und Sonden für den Virusnachweis sind in Tabelle 5 mit Bezeichnung, Sequenzlokalisierung im jeweiligen Genom und Schmelztemperatur angegeben.

**Tabelle 5:**  
Charakteristika der Primer und Sonden in den unterschiedlichen PCR-Ansätzen zum Virusnachweis.

| Virus/Oligo           | Sequenz (5'>3')                               | Genomlokalisierung          | Acc. No.          | T <sub>m</sub> (°C) |
|-----------------------|---|-----------------------------|-------------------|---------------------|
| <b>RNA-Viren</b>      |   |                             |                   |                     |
| <b>Enteroviren</b>    |   |                             |                   |                     |
| EntV1s                | CAA gCA CTT CTg TTT CCC Cgg                   | 5'NCR 168-191 nt            | AJ131523          | 42                  |
| EntV2as               | ATT gTC ACC ATA AgC AgC CA                    | 5'NCR 581-609 nt            |                   |                     |
| EntV5s                | TAC TTC gAg AAA CCY AgT A                     | 5'NCR 248-267 nt            |                   |                     |
| EntV80as              | AAC ACg gAC ACC CAA AgT A                     | 5'NCR 547-566 nt            |                   |                     |
| <b>Influenzavirus</b> |   |                             |                   |                     |
| <i>Typ A</i>          |   |                             |                   |                     |
| AM-151s               | CAT ggA ATg gCT AAA gAC AAg gAC C             | M-Gen 151-174 nt            | Z26862            | 60                  |
| AM-397as              | AAG TgC ACC AgC AgA ATA ACT gAg               | M-Gen 374-397 nt            |                   |                     |
| AM-245TM              | F-CTg CAg CgT AgA CgC XTT TgT CCA AAA Tg-p    | M-Gen 245-272 nt            |                   |                     |
| <i>Typ B</i>          |   |                             |                   |                     |
| BHA-188s              | AgA CCA gAg ggA AAC TAT gCC C                 | HA-Gen 188-209 nt           | D38646            | 60                  |
| BHA-347as             | CTg TCg TgC ATT ATA ggA AAg CAC               | HA-Gen 324-347 nt           |                   |                     |
| BHA-307TM             | F-ACC TCC ggC AAA AgC XTT CAA TAC TCC A-p     | HA-Gen 273-299 nt           |                   |                     |
| <b>Hantavirus</b>     |   |                             |                   |                     |
| <i>Dobrava</i>        |   |                             |                   |                     |
| DOB-FP1s              | Tgg CTT gAC CTC CCg Tg                        | S-Segment 750-766 nt        | L41916            | 60                  |
| DOB-RP1as             | CAA gCg CTC CTT gTC TTT gA                    | S-Segment 836-855 nt        |                   |                     |
| DOB-P1TM              | F-ATC TCC AAC gTC TTT gAC CAA Agg CCC T-p     | S-Segment 785-811 nt        |                   |                     |
| <i>Puumala 1</i>      |   |                             |                   |                     |
| PUUFPunis             | TAg TAg ACT CCT TgA ARA gCT RCT ACg A         | S-Segment 4-31 nt           | X61035            | 60                  |
| PUURP1as              | ggg TCC ACT TCC ACT gCT                       | S-Segment 132-149 nt        |                   |                     |
| PUUP1TM               | F-TgA CAg ATA TCC AAg Agg ATA TAA CCC gCC T-p | S-Segment 53-82 nt          |                   |                     |
| <i>Puumala 2</i>      |   |                             |                   |                     |
| PUUP2TM               | F-TgA CAg ACA TCC AAg Agg AgA TAA CCC gT T-p  | S-Segment 53-80 nt          | M32750            | 60                  |
| <i>Puumala 3</i>      |   |                             |                   |                     |
| PUURP3as              | gAg TTT YTg TCT ggC AgC AA                    | S-Segment 98-117 nt         | AJ223368          | 60                  |
| PUUP3TM               | F-ACg AgA TAA CCC gCC ATg AAC AgC T-p         | S-Segment 68-91 nt          |                   |                     |
| <b>DNA-Viren</b>      |   |                             |                   |                     |
| <b>Adenoviren</b>     |   |                             |                   |                     |
| AdVs                  | TgA TgC CgC AgT ggT CTT ACA TgC AC            | Hexon-Gen 241-266 nt        | Poddar,           | 68                  |
| AdVas                 | TCC AgC CCg Cgg ATg TCA AAg TA                | Hexon-Gen 522-547 nt        | 1999              |                     |
| <b>HCMV</b>           |   |                             |                   |                     |
| CMVs                  | gCA gAg CTC gTT TAg TgA ACC                   | IE-Gen -21-(-2) nt          | Olive et al.,     | 55                  |
| CMVas                 | ggC ACg ggg AAT CCg CgT TCC                   | IE-Gen 82-102 nt            | 1989              |                     |
| <b>Parvovirus B19</b> |   |                             |                   |                     |
| B19s                  | CCT AgA AAA CCC ATC CTC TCT gTT               | VP1/NS1-Region 2599-2622 nt | Donoso-M. et al., | 60                  |
| B19as                 | CCA ggC TTg TgT AAg TCT TCA CTA g             | VP1/NS1-Region 2799-2775 nt | 2004a             |                     |
| B19TM                 | F-CCT CTA ggT TCT gCA TgA CTg CTA C Tgg A-p   | VP1/NS1-Region 2729-2757 nt |                   |                     |

s, sense-Primer; as, antisense-Primer; TM, Sonde; F, FAM; T, TAMRA mit Thymidinen; p, 3'-Phosphat; nt, Nukleotidzahl; Acc. No., GenBank Accession number; Tm, Schmelztemperatur. IUB-Codes: Y= C/T; X= modifizierte Base; R= A/G.

### 2.2.4.1 Reverse-Transkriptase-Reaktion

Für den Nachweis von RNA-Viren ist vor der Amplifikation der Zielsequenz eine Reverse-Transkriptase-Reaktion (cDNA-Synthese) notwendig, um komplementäre DNA (cDNA) als geeignete Matrize für die Taq-Polymerase zu erhalten. Hierzu werden RNA-abhängige DNA-Polymerasen (Reverse-Transkriptasen) eingesetzt, die in der

Lage sind, RNA in DNA umzuschreiben. Diese kann in einem zweiten Schritt wieder in einer PCR-Reaktion eingesetzt werden. Auch ist es möglich, durch den Einsatz spezieller Polymerasen (z.B. Tth oder Tfl), beide Schritte zu kombinieren. Der Vorteil liegt im geringen Aufwand, doch ist die Empfindlichkeit größer, wenn man cDNA-Synthese und PCR getrennt durchführt.

Eine geringe Effizienz der RT-Reaktion kann zum Fehlen eines Amplifikationsproduktes in der nachfolgenden PCR führen. Durchschnittlich werden nur 10-30 % der ursprünglichen RNA-Moleküle in cDNA umgeschrieben. Deshalb muss die geringe Effizienz der RT-Reaktion durch eine hinreichende Menge an Ausgangsmaterial (0,5 bis 1 µg RNA) ausgeglichen werden.

Zum Umschreiben der RNA in einzelsträngige cDNA wurde in dieser Arbeit, je nach Untersuchung, einer von zwei verschiedenen Ansätzen gewählt: entweder RT-Ansatz I, hier wurde die RNA mit Zufallsoligodesoxynukleotiden (*random primers*), meist Hexameren, transkribiert; oder RT-Ansatz II, hier wurde spezifisch eine Zielsequenz mit Hilfe des antisense-Primers umgeschrieben (siehe Protokollschema auf der folgenden Seite):

| RT-Ansätze zum Nachweis von RNA-Viren (Protokolle) |   |
|--|---|
| Ansatz I (random primers)                          | Ansatz II (spezifischer Primer)               |
| Arbeitsvolumen: 20 µl<br>davon 12,5 µl RNA-Probe   | Arbeitsvolumen: 10 µl<br>davon 5 µl RNA-Probe |
| Zusammensetzung des RT-Mixes:                      | Zusammensetzung des RT-Mixes:                 |
| 5x RT-Puffer 4,0 µl                                | Molekularwasser 1,0 µl                        |
| dNTPs [2,5 mM] 1,6 µl                              | 5x RT-Puffer 2,0 µl                           |
| DTT [0,1 M] 0,5 µl                                 | dNTPs [10 mM] 0,5 µl                          |
| random primers [25 µM] 0,4 µl                      | DTT [0,1 M] 0,5 µl                            |
| RNase-Inhibitor [40 U/µl] 0,5 µl                   | antisense-Primer [25 µM] 0,5 µl               |
| SuperScript® II [200 U/µl] 0,5 µl                  | RNase-Inhibitor [40 U/µl] 0,25 µl             |
|  | M-MLV-RT [200 U/µl] 0,25 µl                   |
| <b>Reaktionsbedingungen:</b>                       | <b>Reaktionsbedingungen:</b>                  |
| <u>prä-cDNA-Synthese</u>                           | 5 min bei der jeweils spezifischen Primer-Tm  |
| RNA-Vorbehandlung 10 min bei 65 °C                 | 20 min bei 37 °C                              |
|  | 5 min bei 95 °C                               |
| <u>cDNA-Synthese</u>                               |   |
| 60 min bei 37 °C                                   |   |
| 5 min bei 93 °C                                    |   |
| Thermozykler: Biometra TRIO Thermoblock            | Thermozykler: Biometra TRIO Thermoblock       |

cDNA-Synthesen mit random primers werden insbesondere dann angewendet, wenn lange RNA-Moleküle umgeschrieben werden sollen oder ein breiteres Untersuchungsspektrum an unterschiedlichen Zielsequenzen erwünscht ist. Die Reverse-Transkriptase aus dem Moloney-Maus-Leukämie-Virus (M-MLV-RT) ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase mit geringer RNase H-Aktivität. Ihr Arbeitsoptimum liegt bei 37 °C. Mit der modifizierten Form SuperScript® II, die keine intrinsische RNase H-Aktivität mehr besitzt, können längere Transkripte gewonnen werden. Beim Arbeiten mit Ansatz I ist vor der eigentlichen RT-Reaktion eine Vorbehandlung der RNA bei 65 °C ratsam, damit sich die RNA-Moleküle besser entfalten und dadurch die random primers später leichter daran hybridisieren können. Mit 95 °C wird die Reaktion gestoppt, und die entstandenen cDNA-Moleküle gehen vollständig von der RNA-Matrize ab.

2.2.4.2 Nachweis von Enteroviren mittels nested Reverse-Transkriptase-PCR

In der Diagnostik wird häufig die „verschachtelte“ PCR-Technik (nested PCR, nPCR) eingesetzt. Hier wird das Amplifikat einer ersten PCR-Reaktion wieder als Ausgangsmaterial in einer zweiten PCR eingesetzt, deren Produkt einen Ausschnitt des Produktes der ersten PCR darstellt. Die zweite PCR sichert als Bestätigungstest die Spezifität des Verfahrens, da hier mitunter die falschen Amplifikationsprodukte der ersten PCR ausselektiert werden. Gleichzeitig steigert die prä-Amplifikation der Zielsequenz die Sensitivität, so dass auch sehr geringe Templatmengen nachgewiesen werden können.

Nachdem die RNA aus den jeweiligen Myokardproben mit RT-Ansatz II unter Verwendung des entsprechenden antisense-Primers EV2 (siehe Tab. 5) umgeschrieben wurde, wurde die cDNA in einer nested PCR zum spezifischen Nachweis von Enteroviren eingesetzt:

| <b>Nested PCR zum Nachweis von Enteroviren aus cDNA (Protokoll)</b> |                  |   |                  |
|---|------------------|---|------------------|
| <b>1. PCR</b>   |                  | <b>2. PCR (nested PCR)</b>                            |                  |
| Arbeitsvolumen: 25 µl<br>davon 5 µl cDNA-Probe                      |                  | Arbeitsvolumen: 25 µl<br>davon 2 µl Produkt der 1.PCR |                  |
| Zusammensetzung des PCR-Mixes:                                      |                  | Zusammensetzung des PCR-Mixes:                        |                  |
| Molekularwasser   | 14,4 µl          | Molekularwasser                                       | 17,4 µl          |
| 10x Taq-Puffer  | 2,5 µl           | 10x Taq-Puffer  | 2,5 µl           |
| MgCl <sub>2</sub> [50 mM]   | 0,75 µl          | MgCl <sub>2</sub> [50 mM]                             | 0,75 µl          |
| dNTPs [2 mM]  | 1,25 µl          | dNTPs [2 mM]  | 1,25 µl          |
| Primer EV1s [25 µM]   | 0,5 µl           | Primer EV5s [25 µM]                                   | 0,5 µl           |
| Primer EV2as [25 µM]  | 0,5 µl           | Primer EV80as [25 µM]                                 | 0,5 µl           |
| Taq-Polymerase [5 U/µl]   | 0,1 µl           | Taq-Polymerase [5 U/µl]                               | 0,1 µl           |
| <b>Reaktionsbedingungen:</b>  |                  | <b>Reaktionsbedingungen:</b>                          |                  |
| 35 PCR-Zyklen   | 30 sec bei 94 °C | 35 PCR-Zyklen   | 30 sec bei 94 °C |
|   | 30 sec bei 42 °C |   | 30 sec bei 42 °C |
|   | 45 sec bei 72 °C |   | 45 sec bei 72 °C |
| Finale Elongation   | 3 min bei 72 °C  | Finale Elongation                                     | 3 min bei 72 °C  |
| Thermozykler: Biometra TRIO Thermoblock                             |                  | Thermozykler: Biometra TRIO Thermoblock               |                  |

Die Identifikation der PCR-Produkte wurde per Gelelektrophorese [Kap. 2.2.5] durchgeführt. Erwartet wurden für das Produkt der 1. PCR eine Fragmentgröße von 440 bp und für das Produkt der nested PCR eine Fragmentgröße von 340 bp. Als Kontrollen dienten aus Zellkultur isolierte RNAs, entweder von Echovirus 30 (Stamm 00-588/1 Rostock) oder (alternativ) Poliovirus Typ 3, die von der AG Dr. Schreiber (RKI) bereitgestellt wurden. Die spezifische DNA der nested PCR wurde für eine Sequenzierungsreaktion [Kap. 2.2.7] und weiterer Typenbestimmung aus dem Gel später extrahiert.

#### 2.2.4.3 Quantitative real-time RT-PCR für den Nachweis von Influenzaviren

Die Gesamt-RNA-Proben aus Myokardgewebe wurden für den Nachweis von Influenzaviren (Typ A und Typ B) unter Verwendung des RT-Ansatzes I umgeschrieben. Der TaqMan<sup>®</sup>-PCR-Assay war unter Verwendung der jeweils spezifischen Primer und Sonden (siehe oben Tab. 5, Seite 65) wie folgt:

| <b>Protokoll zum quantitativen real-time PCR-Nachweis für Influenzavirus-cDNA</b> |            |   |                  |
|---|------------|---|------------------|
| <b>Assay-Zusammensetzung</b>  |            | <b>Reaktionsbedingungen</b>                   |                  |
| cDNA-Probe  | 2,5 µl     | UDG-Behandlung                                | 2 min bei 50 °C  |
| 10x Taq-Puffer+ROX  | 2,45 µl    | Initiale Denaturierung                        | 10 min bei 95 °C |
| dNUTPs [2,5 mM]   | 2,0 µl     |   |                  |
| MgCl <sub>2</sub> [25 mM]   | 4,0 µl     | 45 PCR-Zyklen                                 | 15 sec bei 95 °C |
| Primer (je 25 µM)   | je 0,5 µl  |   | 60 sec bei 60 °C |
| Taq-Polymerase [100 U/µl]   | 0,25 µl    | Thermozykler:                                 |                  |
| Sonde [20 µM]   | 0,25 µl    | ABI Prism <sup>®</sup> 5700 Sequence Detector |                  |
| UDG [100 U/µl]  | 0,25 µl    | ABI Prism <sup>®</sup> 7700 Sequence Detector |                  |
| Molekularwasser   | ad 25,0 µl |   |                  |

Als positive Kontrollen wurden für die Influenzavirus-PCR RNA-Proben vom NRZ für Influenza (Dr. Schweiger, RKI) bereitgestellt. Dabei wurden jeweils die Stämme der jeweiligen Grippesaison berücksichtigt: Saison 2001/2002 (A/Beijing und B/Johannisburg), Saison 2002/2003 sowie Saison 2003/2004 (A/Moscow und B/HongKong).

Alle TaqMan<sup>®</sup>-Ansätze in dieser Arbeit wurden zuvor mit einer UDG-Reaktion als zusätzliche Kontaminationsvermeidung gestartet. Uracil-DNA-Glykosylase entfernt alle Uracil-Reste aus der Zuckerbindung von einzel- und doppelsträngiger DNA, ohne dass der Phosphodiester-Strang beschädigt wird. Auf diese Weise werden mögliche Uracil-haltige PCR-Produkte, die als Kontamination zuvor in den Ansatz gelangen konnten, für einen weiteren TaqMan<sup>®</sup>-PCR-Lauf als Matrize unbrauchbar gemacht. Nach Inaktivierung bei 95 °C kann anschließend die Amplifikationsreaktion unter Verwendung eines Uracil-haltigen Desoxynukleosidtriphosphat-Mixes erfolgen. Die Auswertung der PCR-Läufe erfolgte computergestützt mit der jeweiligen dem Thermozykler-Typ zugehörigen Software (Applied Biosystems).

#### 2.2.4.4 Quantitative real-time RT-PCR für den Nachweis von Hantaviren

Die Gesamt-RNA-Proben aus Myokardgewebe wurden für den Nachweis von Hantaviren (Serotypen: Dobrava und Puumala) unter Verwendung des RT-Ansatzes I umgeschrieben. Der TaqMan<sup>®</sup>-PCR-Assay war unter Verwendung der jeweils spezifischen Primer und Sonden (siehe Tab. 5) wie folgt:

| Protokoll zum quantitativen real-time PCR-Nachweis für Hantaviren-cDNA |            |   |                  |
|--|------------|---|------------------|
| Assay-Zusammensetzung  |            | Reaktionsbedingungen                          |                  |
| cDNA-Probe   | 2,5 µl     | UDG-Behandlung                                | 2 min bei 50 °C  |
| 10x Taq-Puffer+ROX   | 2,45 µl    | Initiale Denaturierung                        | 10 min bei 95 °C |
| dNUTPs [2,5 mM]  | 2,0 µl     |   |                  |
| MgCl <sub>2</sub> [25 mM]  | 4,0 µl     | 45 PCR-Zyklen                                 | 15 sec bei 95 °C |
| Primer (je 10 µM)  | je 0,5 µl  |   | 30 sec bei 60 °C |
| Taq-Polymerase [100 U/µl]  | 0,25 µl    | Thermozykler:                                 |                  |
| Sonde [10 µM]  | 0,25 µl    | ABI Prism <sup>®</sup> 5700 Sequence Detector |                  |
| UDG [100 U/µl]   | 0,25 µl    | ABI Prism <sup>®</sup> 7700 Sequence Detector |                  |
| Molekularwasser  | ad 25,0 µl |   |                  |

Als positive Kontrollen und zur Sensitivitätsüberprüfung wurden für die Hantavirus-PCR Verdünnungen von *in vitro* transkribierten Standard-RNAs verwendet, die auf dem jeweiligen S-Fragment des Nucleocapsid-Gens beruhend hergestellt wurden. Die Standard-RNAs wurden freundlicherweise von Hr. Dr. M. Weidmann (Universitätsklinikum Freiburg) zur Verfügung gestellt.

**2.2.4.5 PCR-Nachweis von Adenoviren**

Für den Nachweis von Adenoviren wurde DNA aus Myokardproben mit folgendem PCR-Assay unter Verwendung der spezifischen Primer (siehe Tab. 5) untersucht (Bauer et al., 1991; Prösch et al., 2002):

| <b>Protokoll: PCR für Adenoviren-Nachweis</b> |            |                             |                  |
|---|------------|-----------------------------|------------------|
| <b>Assay-Zusammensetzung</b>                  |            | <b>Reaktionsbedingungen</b> |                  |
| DNA-Probe                                     | 300 ng     | 35 PCR-Zyklen               | 30 sec bei 95 °C |
| 10x Taq-Puffer                                | 5,0 µl     |                             | 30 sec bei 55 °C |
| dNTPs   | 200 µM     |                             | 60 sec bei 72 °C |
| MgCl <sub>2</sub>                             | 4 mM       |                             |                  |
| Primer  | je 25 pg   |                             |                  |
| Taq-Polymerase [100 U/µl]                     | 2,5 U      | Thermozykler:               |                  |
| Molekularwasser                               | ad 50,0 µl | Biometra TRIO Thermoblock   |                  |

Die Identifikation des PCR-Produkts wurde per Gelelektrophorese [Kap. 2.2.5] durchgeführt. Erwartet wurde eine Fragmentgröße von 281 bp. Als Kontrolle diente aus Zellkulturüberständen isolierte DNA von Adenovirus Serotyp 5.

**2.2.4.6 PCR-Nachweis von HCMV**

Für den Nachweis des HCMV wurde DNA aus Myokardproben mit folgendem PCR-Assay unter Verwendung der spezifischen Primer (siehe Tab. 5) untersucht (Bauer et al., 1991; Prösch et al., 2002):

| <b>Protokoll: PCR für HCMV-Nachweis</b> |            |                             |                  |
|---|------------|-----------------------------|------------------|
| <b>Assay-Zusammensetzung</b>            |            | <b>Reaktionsbedingungen</b> |                  |
| DNA-Probe                               | 300 ng     | 35 PCR-Zyklen               | 30 sec bei 95 °C |
| 10x Taq-Puffer                          | 5,0 µl     |                             | 30 sec bei 55 °C |
| dNTPs                                   | 200 µM     |                             | 60 sec bei 72 °C |
| MgCl <sub>2</sub>                       | 4 mM       |                             |                  |
| Primer                                  | je 50 pg   |                             |                  |
| Taq-Polymerase [100 U/µl]               | 2,5 U      | Thermozykler:               |                  |
| Molekularwasser                         | ad 50,0 µl | Biometra TRIO Thermoblock   |                  |

Die Identifikation des PCR-Produkts wurde per Gelelektrophorese [Kap. 2.2.5] durchgeführt. Erwartet wurde eine Fragmentgröße von 123 bp. Als Kontrolle diente aus Zellkulturüberständen isolierte DNA von HCMV (Stamm AD 169).

#### 2.2.4.7 Quantitativer PCR-Nachweis von Parvovirus B19

Die hier verwendeten Primer- und Sondensequenzen (siehe Tab. 5) wurden in Kooperation mit Hr. Dr. A. Nitsche (ZBS-1, RKI) nach generellen Maßstäben für das Primer- und Sondendesign zu real-time PCR-Zwecken computergestützt ausgewählt. Folgendes Assay wurde für den Nachweis von PVB19-DNA in Myokardproben etabliert und angewendet (Donoso Mantke et al., 2004a):

| Protokoll zum quantitativen real-time PCR-Nachweis für PVB19 |            |   |                  |
|--|------------|---|------------------|
| Assay-Zusammensetzung  |            | Reaktionsbedingungen                          |                  |
| DNA-Probe  | 2,5 µl     | UDG-Behandlung                                | 2 min bei 50 °C  |
| 10x Taq-Puffer+ROX   | 2,45 µl    | Initiale Denaturierung                        | 10 min bei 95 °C |
| dNUTPs [2,5 mM]  | 2,0 µl     |   |                  |
| MgCl <sub>2</sub> [25 mM]                                    | 4,0 µl     | 45 PCR-Zyklen                                 | 15 sec bei 95 °C |
| Primer (je 25 µM)  | je 0,5 µl  |   | 60 sec bei 60 °C |
| Taq-Polymerase [100 U/µl]                                    | 0,5 µl     | Thermozykler:                                 |                  |
| Sonde [20 µM]  | 0,25 µl    | ABI Prism <sup>®</sup> 5700 Sequence Detector |                  |
| UDG [100 U/µl]   | 0,5 µl     | ABI Prism <sup>®</sup> 7700 Sequence Detector |                  |
| Molekularwasser  | ad 25,0 µl |   |                  |

Zur Etablierung der Methode wurden für die Sensitivitätsüberprüfung Verdünnungen des pPVB19-CR2.1T-Plasmids (Genexpress, Berlin) angewendet, die zuvor mit Hilfe des WHO Internationalen PVB19 DNA-Standards (99/800, NIBSC) eingestellt und überprüft wurden. Die Spezifität der Methode wurde mit Nicht-PVB19-Kontrollen der anderen viralen Erreger überprüft. Zur Inhibitionsüberprüfung wurden PVB19-negative Myokardlysate mit 100 µl 10-fach-Verdünnungen Plasmid-DNA gespickt. Außerdem wurden als klinische Negativkontrollen DNA-Proben von 50 gesunden Blutspendern verwendet, die zuvor aus Heparin-Plasma-Proben mit Hilfe des QIAamp<sup>®</sup> DNA Blood Kit (Qiagen) gemäß Herstellerangaben isoliert wurden.

2.2.4.8 Quantitativer Nachweis von zellulären Referenzgennukleinsäuren

Die Detektion von Nukleinsäuren sog. Haushaltsgene (*housekeeping genes*) dient zum einem als Nachweis dafür, dass die Probenaufarbeitung qualitativ gut war und inhibitorische Effekte für mögliche negative PCR-Resultate nicht verantwortlich waren. Zum anderem dient der Nachweis als externer Standard, um die Menge an spezifischem Produkt auf das Referenzgen beziehen zu können, dessen Menge man für eine Konstante hält. Aufgrund der unterschiedlichen Regulierung dieser Gene in den Zellen können unterschiedliche Werte in den verschiedensten Geweben nachgewiesen werden. I.d.R. nimmt man mehr als ein Referenzgen als externen Standard und wenn möglich solche, die mehr oder weniger in den verschiedensten Geweben konstant exprimiert werden. Mit human  $\beta$ -Aktin, GAPDH und RNA-Polymerase II (RPII) als Referenzgene wird ein großes Nachweisspektrum von in Myokardgewebe schwach bis stark präsenten Nukleinsäuren abgedeckt. Das folgende quantitative PCR-Assay wurde für die jeweiligen Referenzgen-Nachweise unter Beachtung der jeweils spezifischen Schmelztemperatur der Primer und Sonden (Aktin: 65 °C; GAPDH: 65 °C; RPII: 67 °C) verwendet:

Protokoll zum quantitativen real-time PCR-Nachweis für Referenzgene ( $\beta$ -Aktin, GAPDH und RPII)

| Assay-Zusammensetzung   |                 | Reaktionsbedingungen                          |  |
|---|-----------------|---|--|
| cDNA-Probe  | 2,5 $\mu$ l     | UDG-Behandlung                                | 2 min bei 50 °C                        |
| 10x Taq-Puffer+ROX  | 2,45 $\mu$ l    | Initiale Denaturierung                        | 10 min bei 95 °C                       |
| dNUTPs [2,5 mM]   | 2,0 $\mu$ l     |   |  |
| MgCl <sub>2</sub> [25 mM]   | 4,0 $\mu$ l     | 45 PCR-Zyklen                                 | 20 sec bei 95 °C                       |
| Primer (je 10 $\mu$ M bei Aktin u. RPII, je 25 $\mu$ M bei GAPDH) | je 0,5 $\mu$ l  |   | 30 sec bei spezifischer T <sub>m</sub> |
| Taq-Polymerase [100 U/ $\mu$ l]                                   | 0,25 $\mu$ l    |   |  |
| Sonde [10 $\mu$ M]  | 0,25 $\mu$ l    | Thermozykler:                                 |  |
| UDG [100 U/ $\mu$ l]  | 0,25 $\mu$ l    | ABI Prism <sup>®</sup> 5700 Sequence Detector |  |
| Molekularwasser   | ad 25,0 $\mu$ l | ABI Prism <sup>®</sup> 7700 Sequence Detector |  |

Für die Erstellung der jeweiligen Standardkurven wurden Verdünnungen von entsprechenden kommerziellen Standard-Plasmiden (Genexpress, Berlin) verwendet (siehe Materialliste).

### 2.2.5 Agarosegelelektrophorese zur Nukleinsäurencharakterisierung

Die Gelelektrophorese ermöglicht nicht nur eine optische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mit Hilfe eines Nukleinsäuren-Längenstandards (Größenmarker) bekannter Konzentration durch Vergleich der Bandenstärken, sondern auch die Identifizierung von PCR-Produkten durch größenspezifische Auftrennung der Amplifikate. Trägt man ein Gemisch unterschiedlich großer Nukleinsäure-Fragmente auf ein Agarosegel auf und legt man dann ein elektrisches Feld an, so wandern die Nukleinsäuren aufgrund ihrer negativen Ladung zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus der Größe der jeweiligen Fragmente und diese bestimmt die einzusetzende Agarosekonzentration sowie die elektrischen Parameter.

In Abhängigkeit von der Größe der aufzutrennenden Nukleinsäuren wurde Agarose in einer Konzentration von 0,5 bis 3,0 % (w/v) in Elektrophoresepuffer verwendet. Als Elektrophoresepuffer diente 1x TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA); dieser wurde gegenüber TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA) aufgrund seiner höheren Pufferkapazität bevorzugt, da dies eine schnellere Elektrophorese bei höherer Spannung erlaubt, ohne dass das Gel dabei schmilzt. Dem Elektrophoresepuffer wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 200 ng/ml zugesetzt. Den Proben wurden vor dem Auftragen 0,1 Volumen Gel-Beladungspuffer zugegeben. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte für 30-60 min bei einer Spannung von 80-110 V. Der Elektrophoreseverlauf konnte anhand des Bromphenolblaus im Beladungspuffer verfolgt werden.

Das im Gel befindliche Ethidiumbromid interkaliert zwischen den benachbarten Basenpaare doppelsträngiger DNA oder bindet an die in zellulären bzw. Gesamt-RNA-Präparationen enthaltenen ribosomalen RNA-Moleküle und emittiert bei UV-Anregung Licht. So können die einzelnen Nukleinsäure-Banden auf dem Gel im UV-Licht (312 nm) sichtbar gemacht werden. Mittels geeigneter Größenmarker (z.B. 100 bp-Leiter oder 28-S- und 18-S-rRNA-Marker) konnte die Größe und/oder Konzentration der jeweiligen Nukleinsäure-Fragmente abgeschätzt werden. Zur Dokumentation der abgeschlossenen Elektrophorese wurde das Gel auf einem UV-Tisch mit einer Sofortbildkamera fotografiert.

Die Agarosegelelektrophorese wurde auch zur präparativen Isolierung doppelsträngiger DNA-Fragmente eingesetzt.

### **2.2.6 Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Zur DNA-Isolierung aus Agarosegelen wurde der QIAquick® Gel-Extraction Kit (Qiagen) verwendet. Das gewünschte DNA-Fragment wurde aus dem Agarosegel mit einem Skalpell sauber herausgeschnitten, in ein Reaktionsgefäß überführt und das Gewicht des Gelstückchens bestimmt. Nach Zugabe des dreifachen Volumens (v/w) an QA-Extraktionspuffer zum Ansatz wurde für 10 min bei 50 °C bis zum vollständigen Schmelzen der Agarose inkubiert. Bei DNA-Fragmenten kleiner als 400 bp wurde dem Ansatz ein Volumen (v/w) Isopropanol p.A. hinzugefügt. Der Ansatz wurde dann auf eine Silikagelmembran-Säule gegeben. Die weitere Vorgehensweise erfolgte gemäß Herstellerangaben. Die benötigten Puffer und Verbrauchsmaterialien waren in dem Kit enthalten.

### **2.2.7 DNA-Sequenzierung**

Die Sequenzanalyse von DNA wurde in modifizierter Form nach der „Dideoxy“-Methode (Sanger et al., 1977) durchgeführt. Die Methode beruht auf der enzymatisch katalysierten Synthese von DNA-Strängen, welche zu dem zu sequenzierenden DNA-Strang komplementär sind. Für die Synthesereaktion werden neben den vier Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dNTPs) auch Dideoxyribonukleotidtriphosphate (ddNTPs) eingesetzt, welche bei Einbau einen Kettenabbruch bewirken. Es entstehen so Fragmente verschiedener Länge mit einem gemeinsamen Startpunkt (5'-Ende) und einem ddNTP am 3'-Ende. Die ddNTPs sind je nach Base mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert. Die Auftrennung der Fragmente in einer Gelelektrophorese zeigt eine Leiter, anhand derer die Sequenz der jeweiligen Basen ermittelt werden kann.

In dieser Arbeit wurde zur Erzeugung und Markierung der PCR-Fragmente das ABI PRISM® Big Dye® Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Bio-

systems) verwendet. Die Anwendung dieses Kits erlaubt, aufgrund der unterschiedlich markierten ddNTPs, den Ansatz der Sequenzierungsreaktion in einem Reaktionsgefäß durchzuführen. Die Analyse erfolgt dann in einer einzigen Spur eines Polyacrylamidgels oder in einer Kapillarelektrophorese.

Zur Sequenzierung wurden 30 bis 100 ng PCR-Produkt mit 5 pmol des verwendeten Primers, 3 µl Big Dye<sup>®</sup> Premix (mit allen hierfür notwendigen Reagenzien) und Molekularwasser ad 10 µl Endvolumen eingesetzt. Die Sequenzierungsreaktion erfolgte in einem Thermozykler (Biometra T Gradient) unter folgenden Bedingungen: Initiale Denaturierung für 2 min bei 96 °C; 25 Zyklen: Denaturierung für 10 sec bei 96 °C, Annealing für 5 sec bei Primer-spezifischer Schmelztemperatur und Elongation für 4 min bei 60 °C.

Die Sequenzierungsansätze wurden nach der Reaktion durch Gelfiltration aufgereinigt und die Proben anschließend in einem Kapillarelektrophorese-Sequenzierautomaten aufgetrennt. Die computergestützte Auswertung von Sequenzdaten erfolgte mit den Programmen BioEdit, SeqMan<sup>®</sup> II und BLAST.

### **2.2.8 *In situ*-Hybridisierung von Myokardgewebeschnitten**

Zur Bestätigung einiger ausgewählter PCR-Befunde wurde die *in situ*-Hybridisierung (ISH) als eine zusätzliche Methode verwendet, die die Möglichkeit eröffnet, Nukleinsäuresonden in Geweben, Zellen, Zellkernen und sogar in Chromosomen sichtbar zu machen. Damit lässt sich eine Zielnukleinsäure gewissermaßen *in vivo* lokalisieren (Leitch et al., 1994). Neben dem Nukleinsäurenachweis (DNA oder RNA) von viralen Erregern in Myokardproben stellt die ISH den Befund gleichzeitig auch in einem histologischen Kontext dar. Nach der Präparation des biologischen Materials markiert man durch Einbau eines radioaktiven oder nicht-radioaktiven Markers eine Nukleinsäuresequenz. Sowohl die hierfür verwendete Sonde als auch das biologische Material werden anschließend denaturiert, damit alle Nukleinsäuren einzelsträngig vorliegen. Unter kontrollierten (stringenten) Bedingungen hybridisiert dann die einzelsträngige Sonde mit einer komplementären einzelsträngigen Zielnukleinsäuresequenz des biologischen Präparats. Das neu gebildete doppelsträngige Molekül

lässt sich aufgrund seiner Markierung nachweisen und die Stelle, an der die Hybridisierung stattgefunden hat, durch mikroskopische Verfahren sichtbar machen. Die Nachweismethode hängt von der Markierung der Sonde ab (z.B. Autoradiographie bei radioaktiv markierten Sonden, Avidin- oder Antikörpernachweis bzw. FISH bei nichtradioaktiv markierten Sonden). In dieser Arbeit wurde der Nachweis durch die AG Prof. Kandolf (Universität Tübingen) mittels ISH mit radioaktiv markierten Sonden durchgeführt.

Myokardproben gleicher Herzlokalisierung wurden am DHZB in 4 %-iger Formalinlösung zur Konservierung von Gewebestrukturen sowie Stabilisierung von zellulärer RNA und DNA fixiert [Kap. 2.2.9]. Insbesondere wenn Proben für RNA-ISH aufgearbeitet werden, sollte man besondere Vorsichtsmaßnahmen gegen RNase-Aktivitäten, ähnlich wie bei der PCR, bei allen Arbeitsschritten treffen. Nach Entwässerung in einer aufsteigenden Ethanolreihe (30 bis 100 %) wurden die fixierten Proben in Paraffin eingebettet. Mit einem Mikrotom wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt, auf einen nicht-beschichteten Objektträger aufgezogen und für den weiteren Nachweis verschickt. Die ISH erfolgte mit <sup>35</sup>S-Isotop-markierten antisense-RNA-Sonden (Ribosonden), die *in vitro* von einem virussequenzspezifischen Vektor in Gegenwart radioaktiv markierter und unmarkierter Nukleotide transkribiert wurden (Einsele et al., 1989; Klingel et al., 1992; Klingel, 2002; Bültmann et al., 2003). Nach der Permeabilisierung der zuvor quervernetzt fixierten Schnitte (z.B. durch Proteinase K-Behandlung), stringenter Hybridisierung und dem Waschen wurden die Objektträger für die Autoradiographie mit einer strahlungssensitiven Emulsion beschichtet und getrocknet. Die Schwärzung des Autoradiogramms entsteht durch die Wechselwirkung von β-Partikeln, die das Isotop ausstrahlt, mit Atomen in der Emulsion. Hierbei werden Silberhalogenide in der Emulsion zu metallischem Silber reduziert, und es entsteht eine unsichtbare Aufzeichnung, die mit gängigen photographischen Methoden entwickelt und fixiert werden kann. Die Silberkörner sind später im Durchlichtmikroskop durch einen roten Filter sichtbar. Man geht davon aus, dass das Zentrum einer Gruppe von Silberkörnern die Stelle repräsentiert, an der eine Sonde hybridisiert hat. Wie deutlich sich die Silberkörner abzeichnen, hängt von der Emissionsenergie des eingesetzten Isotops ab. Die Entwicklung der Photoemulsion mit <sup>35</sup>S dauerte drei Wochen. Anschließend wurden die Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin (HE) angefärbt, um histologische Strukturen des Präparats sichtbar zu machen.

### 2.2.9 Histopathologische Bewertung der Explantate

Im Rahmen der Arbeiten des Homograftlabors (AG Prof. Meyer) am DHZB wurden routinemäßig die hier untersuchten Explantate qualifiziert und standardisiert, histomorphologisch untersucht und anschließend bewertet. Diese Daten wurden zum Vergleich mit den PCR-Befunden herangezogen.

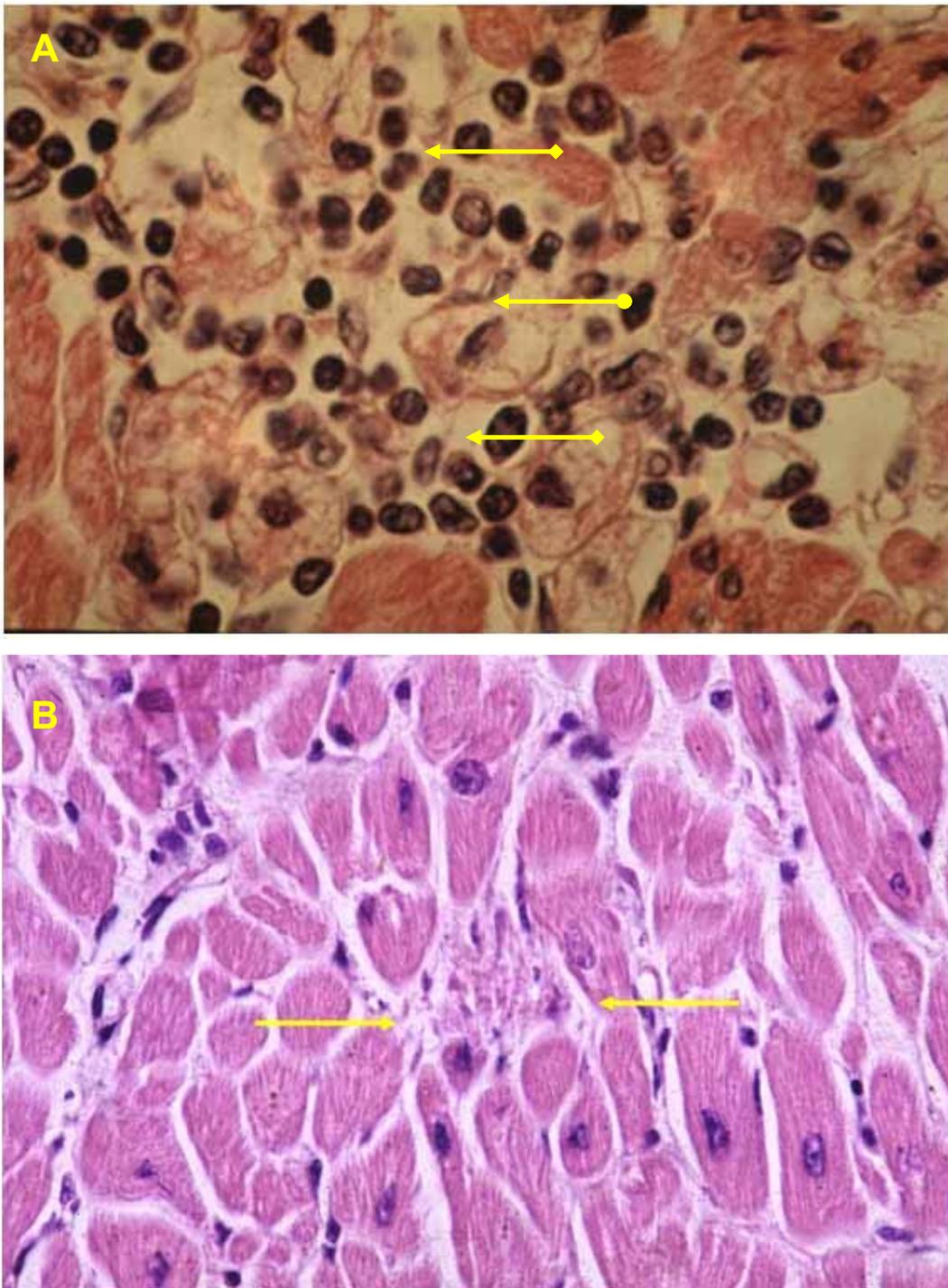
Nach Abschluss der jeweiligen Präparationen wurde das gesamte Herz in 4 %-iger, neutraler, gepufferter Formalinlösung bei RT für mindestens 12 Stunden vor der standardisierten Probenentnahme fixiert. Myokardproben gleicher Lokalisationen wie für die PCR-Diagnostik (LVVW, LVHW, RV und Septum) wurden mit einer Kantenlänge von 10 mm herausgeschnitten. Des Weiteren wurden aus den zentralen Abschnitten der Koronararterien jeweils 5 mm große, alle Wandschichten der Koronararterien umfassende Proben entnommen. Zum Probenumfang gehörte letztendlich auch eine Probenentnahme aus dem supralvalvulären Anteil der *Aorta ascendens* und der *Arteria pulmonalis*. Alle Proben wurden zunächst entwässert und anschließend in Paraffin eingebettet. Für die Anfertigung eines Präparats wurden jeweils 1 bis 3 µm dicke Schnitte auf mit aktiviertem 3-Aminopropyltriethoxy-Silan (APES) beschichteten Objektträgern gezogen, um die Haftung des Schnittpräparats zu verbessern. Nach Entparaffinierung in Xylol und Rehydrierung in einer absteigenden Ethanolreihe (90 bis 70 % und aq. dest.) wurden die Schnitte verschiedenen Färbetechniken unterzogen: Übersichtsfärbung HE, verschiedene Färbungen für Bindegewebe und elastischen Strukturen, Färbung interstitieller Strukturen im Myokard.

Mit Hämatoxilin-Eosin (HE) als Übersichtsfärbung werden saure Moleküle im Schnitt durch das Hämatoxilin dargestellt, so dass die Kerne (aber auch saure Schleimsubstanzen, Bakterien und Kalk) blau erscheinen. Das Zytoplasma der Zellen, Kollagen und proteinhaltige Lösungen werden nuanciert rot angefärbt. Mit der HE-Färbung der Präparate lassen sich die meisten diagnostischen Fragestellungen beantworten. Zur Darstellung von bindegewebigen bzw. elastischen Strukturen wird für die Myokardproben Siriusrot verwendet; für die Koronararterien und die Aorta bzw. die *Arteria pulmonalis* die Elastica-van-Gieson-Färbung benutzt, mit der Kollagen rot dargestellt wird. Die Beurteilung der elastischen Fasern ist wichtig insbesondere bei der

Diagnostik von größeren Blutgefäßen. Weitere wichtige Spezialfärbungen für die Gefäße sind die purpurrote PAS-(Perjodsäure-Schiffsches Reagens-)Färbung sowie die Alzianblau-Färbung zur Darstellung von sauren Mucopolysacchariden. Darüber hinaus wird zur Sicherstellung von frischen Myozytolyse im Myokard eine modifizierte Fibrindarstellung mittels Gomori-Färbung angefertigt.

Die histologische Untersuchung wurde mit einem Durchlichtmikroskop durchgeführt, hierbei wurden folgende Parameter/Fragestellungen nach einem einheitlichen Graduierungsstandard bewertet (Donoso Mantke et al., 2003):

1. Beurteilung der Größen und Kaliberunterschiede der Herzmuskelzellen sowie ihre Verteilung einschließlich der Bewertung möglicher Störungen der Myokardarchitektur.
2. Bewertung der Größe und Form der Herzmuskelzellkerne.
3. Erfassung des Ausmaßes und der Verteilung einer Fibrose sowie möglicher Narben.
4. Beurteilung der Qualität der Endothelzellen und
5. Bewertung der Wandveränderungen der Blutgefäße, insbesondere im Bereich der terminalen Strombahn.
6. Nachweis bzw. Ausschluss pathologischer Veränderungen wie Zeichen einer Myokarditis (Abb. 10a), Folgen einer koronaren Herzkrankheit, Hinweiszeichen für Kardiomyopathie oder Schäden im Rahmen der Spenderkonditionierung (Abb. 10b).



**Abbildung 10: Exemplarische Darstellungen pathologischer Veränderungen, die zur Ablehnung eines Spenderorgans führen würden.**

**A** Floride rundzellige Myokarditis (Pfeil mit Rautenmarkierung: lymphozytäre Infiltrate; Pfeil mit Kreismarkierung: nekrotische Myozyte). **B** Einzelzellnekrose durch Konditionierungsschaden (durch Pfeile markiert). Vergrößerung ca. 300x.

Bilder: AG Prof. R. Meyer, DHZB

Das Ergebnis der jeweiligen histologischen Untersuchungen wurde in Form einer Diagnose für alle untersuchten Myokardproben sowie für das gesamte Herz in einem Befundbericht zusammengefasst. Abschließend erfolgte eine Bewertung über die Verwendbarkeit der Homografts.

### 2.2.10 Serologische Untersuchungen mittels ELISA

Mit Hilfe indirekter Nachweismethoden von Virusinfektionen kann die Immunreaktion, die sich während der Infektion gegen die jeweiligen Erreger ausbildet, bestimmt werden. Man weist dabei im Serum der Patienten Antikörper nach, die spezifisch an definierte Virusproteine binden. IgM-Antikörper weisen darauf hin, dass es sich um eine akute oder erst kürzlich erfolgte Infektion handelt. IgG-Antikörper lassen hingegen auf eine länger zurückliegende, bereits abgelaufene Infektion schließen. Vor allem für die Diagnostik akuter Infektionen ist es wichtig, dass man die Konzentration der IgM- bzw. IgG-Antikörper im Infektionsverlauf bestimmt. Die Antikörper lassen sich mit ELISA-, Immunfluoreszenz- [siehe Kap. 2.2.14] oder Western Blot-Tests nachweisen.

Beim herkömmlichen ELISA-(*enzyme linked immunosorbent assay*-)Test wird das Antigen, d.h. bestimmte Virusproteine oder –partikel, vorgegeben, welches an die Mikrotiterplatten gebunden ist. Die Patientenseren, in denen die fraglichen Antikörper nachgewiesen werden sollen, werden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten pipettiert. Die in den Proben vorhandenen Antikörper binden an das Antigen. Nach sorgfältigem Waschen, bei dem alle nicht gebundenen Serumbestandteile entfernt werden, werden zur Nachweisreaktion Peroxidase-gekoppelte, sekundäre Antikörper hinzugegeben, die spezifisch den Fc-Anteil von menschlichen IgM oder IgG erkennen und daran binden. Im anschließenden Waschvorgang wird überschüssiges Konjugat entfernt. Durch Zugabe des chromogenen Substrats Tetramethylbenzidin (TMB) entsteht eine blaue Farbreaktion, die durch Abstoppen mit einer Säurelösung (Citrat, Phosphat oder Sulfat) nach gelb umschlägt und photometrisch gemessen wird. Der Absorptionswert ist proportional zu der in der Probe enthaltenen Konzentration an spezifischen Antikörpern.

In dieser Arbeit wurden, sofern vorhanden, Patientenseren mittels kommerzieller ELISA-Tests auf Präsenz von Antikörpern gegen Enteroviren (Genzyme Virotech), Adenoviren (BAG) oder Parvovirus B19 (Mikrogen) getestet. Die einzelnen Arbeitsschritte wurden nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Die benötigten Puffer und Verbrauchsmaterialien waren in den jeweiligen Kits enthalten. Die photometrische Bestimmung erfolgte unmittelbar nach Abstoppen der Reaktion bei 450 nm in einem Mikrotiterplattenphotometer (SLT Laborinstruments Austria) und wurde gegen den Substrat-Leerwert gemessen.

Die serologischen Befunde wurden mit den PCR- und histopathologischen Befunden verglichen. Für den Serostatus auf HCMV wurden die Patientendaten vom DHZB eingesehen.

### **2.2.11 Zellkultur, Stammhaltung und Zellzahlbestimmung**

Für die Virusanzucht und Infektionsstudien von Ljunganviren wurden unterschiedliche adhärente Zelllinien verwendet: Vero-B4, BHK-21, 3T3, Mv 1 Lu, CHO und LTK. Die Haltung der Mykoplasmen-freien Zellen erfolgte in Kulturflaschen verschiedener Größen bei 37 °C in einem mit 5 % CO<sub>2</sub> begasten Feuchtbrutschrank. Als Kulturmedien wurden RPMI 1640-Fertigmedium oder DMEM unter Zusatz von 10 % fötales Kälberserum (FKS), 1% Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin und (im Falle von DMEM) 2% nicht-essentielle Aminosäuren eingesetzt. Alle vier Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Zum Passagieren wurde das Kulturmedium entfernt, der Zellrasen mit Diluent und Trypsinlösung gewaschen und für ca. 10 min bei 37 °C bis zum Ablösen der Zellen inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in Kulturmedium resuspendiert, im Verhältnis 1:10 verdünnt und in neue Kulturgefäße überführt. In der Regel wurden die Zellen je nach Dichte zwei Mal pro Woche passagiert. Hierzu wurde das Zellwachstum regelmäßig unter dem Invert-Mikroskop (10er Okular) kontrolliert.

Für das Einfrieren von Zellen (Stammhaltung) wurden die Zellen einer konfluent bewachsenen großen Zellkulturflasche (175 cm<sup>3</sup>) mit Medium gewaschen, abtrypsinisiert und in 10 ml frischem Medium aufgenommen. Die Zellen wurden anschließend bei 800 UpM in einer Eppendorf-Zentrifuge 5403 für 10 min zentrifugiert. Die pelletierten

Zellen wurden nachfolgend mit 5 ml Freeze-Mix resuspendiert, in Kryoröhrchen aliquotiert und für eine Woche bei -80 °C eingefroren. Danach erfolgte die Lagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff. Für das Auftauen von eingefrorenen Zellen wurde ein Kryoröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und sofort in warmes Wasser gehalten. Anschließend wurde die aufgetaute Zellsuspension in eine Kulturflasche (i.d.R. 25 cm<sup>3</sup>) pipettiert, mit frischem Medium aufgefüllt und bei 37 °C im CO<sub>2</sub> begasten Brutschrank kultiviert.

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Rich, 1977). Hierfür wurden 10 µl einer 1:10 verdünnten Zellsuspension unter ein Deckgläschen auf die Zählkammer aufgebracht und 4 Eckquadrate ausgezählt (Volumen 0,4 µl). Die Zellzahl (N) wurde gemittelt und auf die Zellsuspension bezogen folgendermaßen berechnet:

$$N \times 1,0/0,1 = N \times 10 = N' \text{ (Zellzahl in 1 } \mu\text{l Zellsuspension)}$$

$$N' \times 1000 = N \times 10^4 \text{ (Zellzahl in 1 ml Zellsuspension)}$$

$$\text{Also: } N \times 10^4 = \text{Zellzahl/ ml Zellsuspension}$$

### 2.2.12 Anzucht von Ljunganviren

Für die Infektionsstudien von Ljunganviren wurden Virusstocks verschiedener Stämme hergestellt: LV 87-012, LV 174F, LV 145SL, LV 342SL, M-1146 und NY 64-7855. Dafür wurden adhärente Zellen zunächst mit Virusüberständen, die freundlicherweise von Hr. Dr. Dr. B. Niklasson (Apodemus AB, Stockholm) zur Verfügung gestellt wurden, in kleinen Kulturflaschen (25 cm<sup>3</sup>) infiziert. Nachdem die infizierten Zellen konfluent gewachsen waren, wurden sie auf größere Flaschen umgesetzt und so lange kultiviert, bis auch diese konfluent zugewachsen waren. Um nun das Virus sowohl aus dem Überstand als auch aus den Zellen zu isolieren, wurden die bewachsenen Flaschen bei -20 °C gelagert. Sobald das Medium eingefroren war, wurden die Flaschen aus dem Gefrierfach entnommen und bei RT angetaut. Mit dem angetauten,

noch vereisten Medium wurde durch Schütteln der Flaschen ein Aufschließen der Zellen erreicht. Nach völligem Auftauen des Mediums wurden die Flaschen erneut eingefroren und der Vorgang insgesamt dreimal wiederholt. Nach Beendigung des Aufschlussvorganges wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und zweimal für 30 min bei 1000 UpM in einer Eppendorf-Zentrifuge 5403 zentrifugiert, um die Zellrückstände zu entfernen. Danach erfolgte eine UZF mit einem SW28 Rotor (25000 UpM; 1,5 h; 4 °C). Die Überstände wurden verworfen und das Viruspellet in 250 µl Medium aufgenommen.

### **2.2.13 Bestimmung des Virustiters verschiedener LV-Stämme und Infektionsstudien in Zellkultur**

Da Ljunganviren schlecht sichtbare Plaques bilden, wurde die Virusmenge einer vorhandenen Suspension in einer Zellkultur titriert und als TCID<sub>50</sub> (*median tissue culture infectious dose*) nach der Methode von Reed und Munch (Burkhardt, 1992) berechnet. Die TCID<sub>50</sub> gibt die Verdünnung (Titer) eines Virus in einer Suspension an, die erforderlich ist, um 50 % der vorhandenen Zellkultur zu infizieren. D.h., diese Einheit gibt an, in welcher errechneten Verdünnung noch im Mittel ein infektiöses Partikel pro Volumeneinheit vorhanden ist, die im Testsystem zur vollständigen Zerstörung des Zellrasens – also zu einer Alles-oder-Nichts-Reaktion führt. Die Methode erlaubt eine Rückrechnung zur unverdünnten Virussuspension. Zur Vorbereitung der Virustiterbestimmung wurde eine 96er-Lochplatte drei Tage vor der Viruszugabe mit ca.  $5 \times 10^5$  Zellen/ml (0,1 ml pro Vertiefung) ausgesät. Nachdem die Zellen zu etwa 60 % konfluent gewachsen waren, wurden sie mit verschiedenen Virusverdünnungen infiziert, wobei eine Reihe mit Zellen auf der Lochplatte jeweils als Negativkontrolle uninferiert blieb. Hierzu wurden Verdünnungsreihen des jeweils zu untersuchenden Virus in 10er-Schritten angesetzt und je Verdünnungsstufe mindestens vier Parallelansätze mit 0,1 ml Probe pro Vertiefung in die Lochplatte hinzugegeben. Im Verlauf der Kultivierung der Lochplatten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden die infizierten Zellkulturen auf das Vorhandensein und das Ausmaß eines zytopathischen Effekts (CPE) – Änderung der Zellform von spindel- zu kugelförmig mit einhergehender Dunkelfärbung sowie Ablösung der Zellen vom Zellrasen – über ca. 7 Tage bis zur vollständigen Zerstörung des Zellrasens (Endverdünnungsmethode)

beobachtet. Die Titerhöhe in TCID<sub>50</sub>/ml wurde mit Hilfe einer Tabellenkalkulation folgendermaßen berechnet:

**Beispiel zur Berechnung der TCID<sub>50</sub> nach Reed und Münch -**

| Kumulative Werte            |                                  |                               |                               |                              |                              |                   |                |
|-----------------------------|----------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------|----------------|
| Infektion                   |                                  |                               |                               |                              |                              |                   |                |
| Virus-<br>verdünnung<br>(A) | Infektions-<br>verhältnis<br>(B) | infizierte<br>Kulturen<br>(C) | nicht inf.<br>Kulturen<br>(D) | Spalte C<br>kumulativ<br>(E) | Spalte D<br>kumulativ<br>(F) | Verhältnis<br>(G) | Prozent<br>(H) |
| 10 <sup>-1</sup>            | 6/6                              | ↑ 6                           | 0                             | 17                           | 0                            | 17/17             | 100            |
| 10 <sup>-2</sup>            | 6/6                              | 6                             | 0                             | 11                           | 0                            | 11/11             | 100            |
| 10 <sup>-3</sup>            | 4/6                              | 4                             | 2                             | 5                            | 2                            | 5/7               | 71             |
| 10 <sup>-4</sup>            | 1/6                              | 1                             | 5                             | 1                            | 7                            | 1/8               | 13             |
| 10 <sup>-5</sup>            | 0/6                              | 0                             | ↓ 6                           | 0                            | 13                           | 0/13              | 0              |

**A: 10er-Verdünnungsreihe im Sechsfach-Ansatz (mindestens Vierfach-Ansatz notwendig)**

**B: Das Infektionsverhältnis entspricht dem Verhältnis der Anzahl infizierter Kulturen/ Gesamtzahl der inokulierten Kulturen bei der jeweiligen Virusverdünnung. Eine Kultur wird bei der Endablesung als „nicht-infiziert“ angesehen, wenn die Zellen keinen CPE anzeigen, und als „infiziert“, wenn sie mindestens einen schwachen CPE aufweisen.**

**CPE-Bewertungsskala:**

**+ = schwacher CPE; ++ = mittelstarker CPE (ca. 50% der Zellen zytopathisch verändert);  
+++ = starker CPE (alle Zellen zytopathisch verändert)**

**C: Anzahl der infizierten Kulturen bei der jeweiligen Virusverdünnung**

**D: Anzahl der nicht-infizierten Kulturen bei der jeweiligen Virusverdünnung**

**E: kumulative Werte bezogen auf Spalte C (Addition in Pfeilrichtung)**

**F: kumulative Werte bezogen auf Spalte D (Addition in Pfeilrichtung)**

**G: kumulative Werte für die Infektionsverhältnisse bei den jeweiligen Virusverdünnungen, bezogen auf die Spalten E und F**

**H: kumulative Infektionswerte in Prozent bei den jeweiligen Virusverdünnungen, bezogen auf die Spalte G (Wo liegt in ungefähr der 50%-Wert ?)**

Zur Berechnung des genaueren Wertes muss der „proportionale Abstand“ (P.A.) ermittelt werden:

$$P.A. = \frac{(\% \text{ Infektion bei Verdünnung unmittelbar über } 50\%) - (50\%)}{(\% \text{ Infektion bei Verdünnung unmittelbar über } 50\%) - (\% \text{ Infektion bei Verdünnung unmittelbar unter } 50\%)}$$

Der P.A.-Wert ist zu korrigieren, indem er mit dem Logarithmus des Faktors multipliziert wird, der für die Verdünnungsreihe gewählt wurde [z.B. bei 10er-Verdünnungsreihen ist der Faktor 1 ( $\log 10 = 1$ )].

Beispielrechnung:

Bei einem Sechsfach-Ansatz mit den Verdünnungsstufen  $10^{-1}$ - $10^{-5}$ , bei dem am Ende aus der Spalte H abgelesen wird, dass der 50%-Wert zwischen  $10^{-3}$  (71 % Infektion) und  $10^{-4}$  (13 % Infektion) liegt, errechnet sich der P.A. folgendermaßen:

$$71 - 50 / 71 - 13 = 21 / 58 = 0,36 (\cong 0,4)$$

Subtrahiert man den korrigierten P.A. (0,4) vom Logarithmus der niedrigeren Verdünnung unmittelbar über dem 50%-Wert (also hier:  $-3$ ), so ergibt sich ein Wert von  $-3,4$ . Somit ist 1 TCID<sub>50</sub> bei einer Virusverdünnung von  $10^{-3,4}$  erreicht, was bedeutet, dass das Virusinokulum einen TCID<sub>50</sub>-Titer von  $10^{3,4}$ /ml aufweist.

Für die Infektionsstudien wurde jeweils ein 60 %-iger konfluenter Zell-Monolayer mit dem zu untersuchenden Virus aus den angefertigten Stocks mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 1 (entspricht 1 Viruspartikel/1 Zelle) infiziert und im Verlauf der Kultivierung die TCID<sub>50</sub> berechnet. Bezieht man den jeweilig berechneten TCID<sub>50</sub>-Wert auf die Zeit (Tage nach Infektion), so lässt sich der zeitliche Verlauf einer Infektion (Virusvermehrung) anhand des zunehmenden CPEs darstellen. Die Zeit bis zum Auftreten des CPEs ist abhängig von der spezifischen Geschwindigkeit der Virusvermehrung und der Menge des verimpften Virus (Inokulum).

### 2.2.14 Indirekter Immunfluoreszenz-Test zum Nachweis des Ljunganvirus

Der indirekte Immunfluoreszenztest (IFT) wurde verwendet, um nach der Infektion von eukaryontischen Zellen mit verschiedenen LV-Stämmen virale Proteine in den Zellen zu detektieren und zu lokalisieren. Für diese Methode wurden zwei Antikörper verwendet, von denen der Primärantikörper spezifisch an das viral exprimierte Protein bindet, während der Sekundärantikörper wiederum spezifisch den Primärantikörper erkennt und an diesen bindet. Der Sekundärantikörper ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt und somit kann das virale Protein auf indirektem Wege unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

Zur Durchführung des IFT wurden Zellen ( $3$  bis  $5 \times 10^5$ /ml) auf  $15$  mm Durchmesser sterilen Glasplättchen ausgesät und in 24er-Lochplatten bzw. auf Objektträgern mit 8er-Lochkammern aus Kunststoff kultiviert. Nachdem die Zellen etwa  $60$  % konfluent gewachsen waren, wurden sie infiziert. Jeden Tag bis einschließlich am Tag des vollständigen CPEs (Ablösung des Zellrasens) wurde jeweils ein Glasplättchen entnommen und i.d.R. gleich weiter bearbeitet.

Für den IFT wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann mit  $4$  % (v/v) Paraformaldehyd in PBS für  $15$  min bei RT fixiert. Nachdem die Zellen erneut gewaschen wurden, erfolgte die Permeabilisierung mit  $0,1$  % (v/v) Triton<sup>®</sup>-X-100 in PBS für  $10$  min bei RT, um ein späteres Eindringen des Antikörpers zu ermöglichen. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Dann erfolgte die Zugabe des Blockpuffers und die anschließende Inkubation für  $1$  h bei RT, um überschüssige Bindungsstellen zu blockieren. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurde der gegen den spezifischen LV-Stamm gerichtete Primärantikörper in der Verdünnung  $1:50$  (mit Albuminazid) auf die Zellen gegeben, so dass die Zellen damit ausreichend benetzt waren. Danach erfolgte die Inkubation in feuchter Atmosphäre für  $1$  h bei RT. Später wurde der überschüssige Primärantikörper mit PBS entfernt, woran sich dann eine  $45$ -minütige Inkubationszeit unter feuchten und dunklen Bedingungen mit dem FITC-gekoppelten-Sekundärantikörper anschloss, der zuvor  $1:300$  mit PBS verdünnt wurde. Überschüssiger Antikörper wurde später durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Anschließend erfolgte ein kurzer Waschschrift mit aq bidest., um störendes Salz zu entfernen. Danach wurden die Glasplättchen

auf einen Objektträger in einen Tropfen Eindeckmedium gelegt und luftdicht fixiert. Den Kammer-Objektträgern wurde die 8er-Loch-Kammer abgenommen und die Zellen gleichfalls mit Eindeckmedium betropft und mit einem passenden Deckgläschen luftdicht verschlossen.

Die lichtmikroskopische Analyse der Fluoreszenzpräparate erfolgte an einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop mit einem Argon-Laser bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm. Die Daten konnten mit einer entsprechenden Software bearbeitet und anschließend in einem Rechner bzw. auf einen Datenträger gespeichert werden.

Der IFT erfolgte parallel zur Virustiterbestimmung, um erste Ergebnisse über den zeitlichen Infektionsverlauf mit Ljunganviren zu erhalten.

### **2.2.15 Elektronenmikroskopische Untersuchungen des Ljunganvirus**

In der Infektionsdiagnostik und für Morphologiestudien von Viren wird zum direkten Nachweis und zur Visualisierung kompletter Viruspartikel häufig die Elektronenmikroskopie herangezogen. Grundsätzlich kommen für die elektronenmikroskopische Virusdiagnostik zwei Präparationstechniken in Frage: die Negativkontrastierung und die Einbettungs- und Ultradünnschnitttechnik. Während bei der Negativkontrastelektronenmikroskopie die im Untersuchungsgut enthaltenen Erreger durch Anlagerung des Kontrastmittels an die Strukturen vor allem von außen dargestellt werden, ermöglicht die Ultradünnschnitttechnik die Darstellung von Virus-Wirtszell-Wechselwirkungen sowie den Blick in zelluläre, möglicherweise virusenthaltende Kompartimente. Nachteilig ist hier der große Zeitaufwand für die Einbettung und Herstellung von Ultradünnschnitten.

In dieser Arbeit wurde die Morphologie von Ljunganvirus in Zellkulturüberständen und in infizierten Zellen mit fortgeschrittenen CPE mittels der Negativkontrastierung studiert. Des Weiteren wurde der virusdiagnostische Nachweis von Ljunganviren in infizierten Mäusepankreasproben, die wir im Rahmen einer Kooperation mit Hr. Dr. Dr. B. Niklasson (Apodemus AB, Stockholm) erhalten haben, mit Hilfe der Ultradünnschnitttechnik durchgeführt. Die Pankreasproben waren zuvor in 2,5 %-igem Glutar-

aldehyd zur Inaktivierung von Proteasen fixiert und stammen von vier verschiedenen Rötelmäusen (*Clethrionomys glareolus*), die alle an Diabetes erkrankt waren. Ein Teil der gleichen Proben wurde zum Department of Medicine, University of Washington, Seattle, WA, USA verschickt, um dort immunhistologische Untersuchungen mit spezifischen Antisera durchzuführen. Sämtliche elektronenmikroskopischen Untersuchungen fanden in Kooperation mit der AG Dr. Gelderblom (ZBS-4, RKI) statt.

### 2.2.15.1 Sedimentierung von Kulturüberständen und Zellen zur Probenpräparation

Zur Probenvorbereitung für die Negativkontrastierung von Viren wurde der Zellkulturüberstand differenziell zur Aufreinigung im SW40-Rotor zentrifugiert: für 15 min bei 6000 UpM, und danach der neue Überstand für 15 min bei 10000 UpM. Anschließend wurde die klare Überstandsprobe mittels UZF für eine Stunde bei 35000 UpM ins Sediment gefahren. Das Sediment wurde zu einem Teil bei -80 °C in aq bidest. und zum anderen Teil in 2,5 %-igem Glutaraldehyd bei 4 °C für die elektronenmikroskopische Untersuchung gelagert.

Zum Nachweis von intrazellulären Viren wurde der Zellrasen abtrypsiniert und die Zellsuspension komplett für 20 min bei 5000 UpM im SW40-Rotor pelletiert. Der Überstand wurde abdekantiert und das Zellpellet in 0,1 M HEPES resuspendiert und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. HEPES ist für Untersuchungen an Proteinen und Zellen gut geeignet, da es sich als stabiles Puffersystem bei enzymatischen Reaktionen inert verhält. Danach wurde das gleiche Volumen 5 %-iges Glutaraldehyd dazugegeben und gevortext. Die Zellen wurden dann bei 4 °C bis zur Weiterverwendung (Einbettung, Zellschnitttechnik, Negativkontrastierung) gelagert.

### 2.2.15.2 Negativkontrastierung

Zur elektronenmikroskopischen Untersuchung werden Partikelsuspensionen auf Trägernetze (sog. Grids) aufgebracht, die zuvor gereinigt, mit einer dünnen, gut durchstrahlbaren Folie aus Pioloform F befilmt und zur thermischen und mechanischen Stabilisierung mit Kohle bedampft wurden. Für die Negativkontrastierung werden Kupfergrids mit relativ kleinen Maschen (300 oder 400 mesh) verwendet.

Die zu untersuchenden Suspensionen und die weiteren für die Präparation benötigten Medien wurden auf einem Streifen Parafilm als einzelne Tropfen (ca. 50 µl) aufgetragen. Ein bis zwei Kupfergrids wurden mit der behandelten Trägerfläche auf die jeweilige Oberfläche eines Tropfens der zu kontrastierenden Partikelsuspension abgelegt. Die Virussuspension wurde einige Minuten zur Adsorption auf dem Grid belassen. Danach wurde die Flüssigkeit mit einem Streifen Filterpapier vom Grid weitgehend abgesaugt. Das Grid wurde in 4 bis 5 Tropfen aq bidest. (je nach Verunreinigung der Probe) kurz durchgezogen, um gröbere Verunreinigungen zu entfernen. Allerdings nicht zu lange, da sonst die Viruspartikel weggespült werden können. Zwischendurch wurde immer wieder kurz abgetupft. Anschließend wurden die Kupfergrids zur Kontrastierung auf je einen Tropfen Uranylacetat gelegt und 5 bis 7 min im Dunkeln inkubiert. Uranylacetat bindet an Phosphatgruppen und fixiert Biomembranen. Das Kontrastmittel wurde im Anschluss mit einem Stück Filterpapier teilweise abgesaugt und das Grid an der Luft getrocknet. Anschließend erfolgte die elektronenmikroskopische Auswertung [Kap. 2.2.15.4].

### 2.2.15.3 Eponeinbettung und Ultradünnschnitttechnik zur Probenpräparation

Die zu untersuchenden Proben (Zellen oder Gewebe) werden für die Ultradünnschnitttechnik jeweils in 2,5 %-igen Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid fixiert, zusätzlich mit Tannin und Uranylacetat behandelt und schließlich in Epon eingebettet. Nach dieser Art von Probenpräparation werden von den Proben Ultradünnschnitte angefertigt, auf einen Kupfergrid mit Bleicitrat nachkontrastiert und am Elektronenmikroskop ausgewertet.

Für die Einbettung und Ultradünnschnitttechnik wurden die Glutaraldehyd-fixierten Zellproben zunächst bei 1000 UpM in einer Eppendorf-Zentrifuge 5403 für 10 min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment mit reichlich PBS aufgenommen und nach erneuter Zentrifugation zweimal mit aq bidest. gewaschen. Die Glutaraldehyd-fixierten Gewebeproben wurden hingegen zweimal für je 10 min mit aq bidest. gewaschen. Vor der Osmiumbehandlung, die den Lipidanteil fixiert, muss im Präparat noch vorhandenes freies Aldehyd ausgewaschen werden, da sonst das Osmiumtetroxid ( $\text{OsO}_4$ ) zu metallischen Osmium reduziert, das sich dann als elektronendichter Niederschlag im Präparat verteilt. Die Gewebeproben mussten

mit einem Skalpell zuvor zerstückelt werden, damit das  $\text{OsO}_4$  später besser einwirken kann. Danach wurde erneut mit aq bidest. gewaschen. Anschließend erfolgte die Osmiumbehandlung mit 1 %-igem  $\text{OsO}_4$  für ca. eine Stunde bei 4 °C und ohne Lichteinwirkung. Die Zellen im Präparat wurden dadurch schwarz gefärbt. Nach der Behandlung wurde das Präparat zweimal in aq bidest. gewaschen (Zellen jeweils sedimentiert; 5 min, 1000 UpM), um überschüssiges  $\text{OsO}_4$  zu entfernen. Alle Arbeiten mit Osmium und anschließend mit Epon werden mit Einweghandschuhen und unter dem Abzug durchgeführt, da diese Substanzen als Haut- und/oder Atemgifte hohe Toxizität besitzen.

Damit die  $\text{OsO}_4$ -geschwärzten Zellen bzw. Gewebeproben in einfacher Weise durch die Einbettungsschritte gebracht werden konnten, wurden sie in 3 %-iger Agarose eingebettet. Die Agaroseblöckchen mit den eingeschlossenen Zellen bzw. Gewebe wurden in 0,1 %-igen Tannin in HEPES (frisch angesetzt) für eine Stunde bei 4 °C im Dunkeln unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Tannin dient zur Kontrastierung von Zellorganellen. Anschließend wurde das Tannin gegen 1 %-iges  $\text{NaSO}_4$  in HEPES ausgetauscht und die Blöckchen für 10 min bei 4 °C im Dunkeln unter gelegentlichem Schütteln gewaschen. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt, um das überschüssige Tannin zu entfernen, bevor das  $\text{NaSO}_4$  gegen aq bidest. ausgetauscht wurde und erneut für 10 min bei 4 °C im Dunkeln gewaschen wurde. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt, bevor das aq bidest. durch 2 %-iges Uranylacetat ersetzt wurde und für 1 Stunde bei 4 °C im Dunkeln unter gelegentlichem Schütteln inkubiert wurde. Die Uranylacetat-Behandlung dient sowohl zur Nachkontrastierung, besonders von Nukleinsäureanteilen, als auch zur Fixation von Biomembranen. Das Uranylacetat wurde im Anschluss gegen aq bidest. ausgetauscht und für 10 min bei 4 °C gewaschen.

Vor dem Einschluss in die hydrophobe organische Epoxidharzmischung musste das biologische Material stufenweise in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50 %, 70 %, 95 % und Propylenoxid) unter ständigem Rotieren in einem Rotationsmischer bei RT entwässert werden. Danach wurde das Propylenoxid durch Epon-Propylenoxid (1:1-Gemisch) ersetzt und über Nacht mit offenen Röhrchen bei RT im Rotationsmischer inkubiert, damit der Propylenoxid-Anteil abdampft. Durch die Verdunstung des leicht flüchtigen Propylenoxid kommt es zur Konzentration des Einbettungsgemischs und

zur gründlichen Infiltration der Proben. Die vollständige Entwässerung und Infiltration wurden durch das völlige Absinken der Agarblöckchen auf den Boden des Röhrchens angezeigt. Danach wurde das zurückgebliebene Epon abgesaugt und durch Epon + 1,3 % (v/v) DMP-30 (Dimethylaminophenol) für zwei bis drei Stunden bei RT unter ständigem Rotieren ersetzt. Zur Einbettung wurden Gelatinekapseln 2 Stunden bei 60 °C getrocknet. Die Blöckchen wurden anschließend mit einer spitzen Nadel auf dem Boden der Kapsel orientiert und diese mit Hilfe einer 5 ml Einwegspritze randvoll mit Epon + 1,3 % (v/v) DMP-30 gefüllt. Zur Kennzeichnung wurden beschriftete Papierschildchen hineingesteckt. Die Gelatinekapsel wurde bei 60 °C im Brutschrank für zwei Tage gebacken, damit das Epoxidharz auspolymerisiert.

Mit der Diamantenfräse eines Trimmgerätes wurden die auspolymerisierten Blöckchen in Pyramidenform zugespitzt und apikal im Objektbereich mit einer trapezförmigen Anschnittfläche versehen. Die Schnitte wurden an einem Ultramikrotom mit einem Diamantenmesser angefertigt. Semidünnschnitte für die Lichtmikroskopie sind 300 bis 500 nm dick. Sie wurden mit einer Metallöse von der Wasseroberfläche abgenommen und auf einen Objektträger abgesetzt. Nach Färbung mit 1 %-iger Toluidinblau/Boraxlösung (5 min) wurden sie zur Kontrolle und zum gezielten Aufspüren von Zellstrukturen am Lichtmikroskop untersucht. Ultradünnschnitte sind – entsprechend der Schnittdicken- und Farbskala von Peachey (im Okular meist silbrig) – 30 bis 50 nm dick. Sie wurden nach dem Spreiten mit einem Xylol-getränkten Filterpapier, das 1 min dicht über die Schnitte gehalten wurde, durch Auftupfen mit unbeduftetem 300 mesh Kupfergrids von der Wasseroberfläche abgenommen und auf Filterpapier in Glaspetrischalen gelegt. Durch die Schnitt-Nachkontrastierung mit alkalischen Bleisalzen wird der Kontrast vor allem an den Strukturen verstärkt, die Uranyl- und  $\text{OsO}_4$ -Ionen gebunden haben. Als möglicher, sehr unerwünschter Nebeneffekt kann dabei aus dem Bleihydroxid und dem  $\text{CO}_2$  der Luft schwerlösliches Bleicarbonat entstehen und als Niederschlag die Schnitte bedecken. Daher erfolgte die Schnittkontrastierung in einer geschlossenen Petrischale, ausgelegt mit einem Streifen Paraffin (Plattenwachs) und geschützt von NaOH-Plätzchen.

Ein Tropfen Bleicitrat und drei Tropfen 0,02 M NaOH wurden auf das Wachs pipettiert. Die Schnitte-tragenden Grids wurden für 15 sec auf das Bleicitrat gelegt und anschließend mit einer Pipette schnell nacheinander durch die NaOH-Tropfen

gezogen und für 3 bis 5 sec in aq bidest. gewaschen. Zum Trocknen wurden die Grids zwischen zwei Filterpapierstreifen angedrückt und anschließend an der Luft getrocknet. Anschließend erfolgte die elektronenmikroskopische Auswertung [Kap. 2.2.15.4].

#### 2.2.15.4 Elektronenmikroskopische Auswertung und fotografische Dokumentation

Die Präparate wurden an einem Transmissionselektronenmikroskop bei einer Primärvergrößerung von 5000:1 bis 40000:1 und bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV unter Verwendung der 30 µm Objektapertur-Kontrastblende ausgewertet. Zur Verminderung der Probenkontamination wurde immer mit Objektraumkühlung durch flüssigen Stickstoff gearbeitet. Die Befunde wurden auf Scientia Planfilmen bei automatischer Belichtungssteuerung mit Zeiten von 0,5 bis 1 sec dokumentiert. Die Negative wurden mit Refinal 8-10 min bei 20 °C entwickelt, Kontaktabzüge sowie Nachvergrößerungen einzelner Negative auf Brovira BN-Fotopapier der Härtegrade 1-5 angefertigt.

#### 2.2.16 Etablierung von RT-PCR-Methoden für den Nachweis von Ljunganviren

Für den Nachweis von LV-spezifischen Nukleinsäuresequenzen im Myokardgewebe von HTx-Patienten und Herzspendern aus dem DHZB (insgesamt 100 verschiedene Proben jeweils aus dem linken Ventrikel), aber auch von anderen Patienten- und Nagetierproben aus Schweden, wurden in dieser Arbeit eine konventionelle RT-PCR sowie erstmalig eine quantitative real-time RT-PCR-Methode in Kooperation mit Hr. Dr. Dr. B. Niklasson (Apodemus AB, Stockholm) etabliert. Zunächst wurden dazu die entsprechenden Primersequenzen nach generellen Maßstäben für das Primer- und Sondendesign, in Zusammenarbeit mit Hr. Dr. A. Nitsche (ZBS-1, RKI), computergestützt innerhalb der konservierten 5'-nicht-codierenden-Region (5'-NCR) des Genoms ausgewählt, um möglichst alle bisher bekannten LV-Typen detektieren zu können. Mit Hilfe einer RNA-Standardkontrolle des LV-Prototyps 87-012 (Apodemus AB), isoliert aus Jungmäusehirn (SMB)-Zellkulturüberständen ( $TCID_{50}$   $6,2 \times 10^3$ ), wurde ein RT-PCR-Protokoll (Kap. 2.2.16.2) ausgearbeitet und die optimale Annealing-Temperatur für die Primer mit einem Gradiententhermozykler (Biometra) ermittelt.

Für die real-time RT-PCR [Kap. 2.2.16.4] wurden zum gruppenspezifischen Nachweis zwei sog. TaqMan<sup>®</sup>-*minor-groove-binder*-Sonden (MGB<sup>®</sup>-*probes*) hergestellt und eingesetzt. Diese haben einen nichtfluoreszierenden Quencher am 3'-Ende, so dass das real-time Detektionssystem den emittierenden Reporterfarbstoff präziser messen kann. Des Weiteren ist am 3'-Ende ein *minor groove binder* lokalisiert. Dabei kann es sich um eine Vielzahl von verschiedenen organischen Ringverbindungen handeln, die mit der einzelsträngigen Ziel-DNA sehr stabile Duplexstrukturen bilden können. Dies bewirkt eine Erhöhung der Schmelztemperatur der Sonde, weshalb es möglich ist, kürzere Sonden zu entwickeln (Kutyavin et al., 2000). Dies ermöglicht es, die Spezifität der Sonde innerhalb komplexer Ziel-DNA-Abschnitte zu erhöhen, indem die Sonde auf kurze spezifische Sequenzen ausgerichtet wird.

Die Spezifität der Nachweismethoden wurde mit aus Zellkulturüberständen extrahierter RNA folgender LV-Stämme überprüft: LV 87-012, LV 174F, LV 145SL, LV 342SL, M-1146, NY64-7855, NY-64-7947. Die RNA wurde zuvor mit Hilfe des QIA-amp<sup>®</sup> Viral RNA Kit (Qiagen) gemäß Herstellerangaben isoliert. Außerdem dienten als Negativkontrollen extrahierte RNA bzw. DNA aus: Echovirus 30 (AG Dr. Schreier, FG15/NRZ, RKI), ADV Serotyp 2, 3, 4, 5, 9, 12, 40 (Fr. Dr. B. Chmielewicz, ZBS-1, RKI), HCMV Stamm AD-169 (AG Dr. Prösch, Charité), Infuenzavirus Typ A und Typ B (AG Dr. Schweiger, FG12/NRZ, RKI), Hantavirus Stamm 76-118, Dobravavirus Stamm Slovenia, Puumalavirus Stamm Sotkamo und Seoulvirus Stamm 80-39 (Hr. Dr. R. Ulrich, Inst. f. Virologie, Charité), PVB19 (99/800, NIBSC), sowie den nahverwandten Viren, das humanpathogene Parechovirus Typ 1 (vormals Echovirus 22) und das Encephalomyocarditisvirus sowie das Theilers Encephalomyelitisvirus, welche beide in Mäusen pathogen sind (Hr. Dr. B. Niklasson, Apodemus AB, Stockholm).

Die Sensitivität der quantitativen real-time PCR wurde mit 10-fach-Verdünnungen eines selbst hergestellten Insert-Plasmids [Kap. 2.2.16.3] überprüft, der das PCR-Produkt der RNA-Standardkontrolle des LV-Prototyps 87-012 aus der RT-PCR enthielt. Zur Inhibitionsüberprüfung wurden Myokardlysate von gesunden Herzspendern mit 100 µl 10-fach-Verdünnungen der RNA-Standardkontrolle gespikt.

Als Sample-Kontrollen wurden insgesamt 60 verschiedene Gewebeproben (aus Hirn, Leber, Lunge, Niere, Pankreas und Herz) von sechs Labormäusen getestet, die intraperitoneal mit LV 145SL infiziert wurden, sowie von vier nicht-infizierten Mäusen. Alle Mäuse wurden nach einer Woche zwecks Probenentnahme seziiert. Des Weiteren wurden von fünf Labormäusen, die ebenfalls zuvor mit LV infiziert wurden und während der Schwangerschaft Symptome von intrauterinem Fruchttod aufwiesen, Plazentaproben entnommen. Schließlich wurden sechs verschiedene Proben (Plazenta oder Nabelschnur) von vier schwedischen Patientinnen mit Diagnose auf Präeklampsie untersucht, sowie ein Schweineisolat (SMB 941), welches zuvor in einem anderen Labor mittels einer semi-nested PCR auf LV positiv getestet wurde.

Alle positiven Befunde wurden zur Kontrolle nach einer Gelelektrophorese und Gel-extraktion im Anschluss direkt sequenziert [siehe Kap. 2.2.7].

#### 2.2.16.1 Primer- und Sondendesign

Folgende Primer- und Sondensequenzen wurden nach einer Alignmentstudie mit 5'-NCR-Sequenzen aus LV 87-012 (GenBank Acc. No. NC003976 und AF327920), LV 174F (Acc. No. AF327921), LV 145SL (Acc. No. AF327922), M-1146 (Acc. No. AF538689) und NY64-7855 (persönliche Mitteilung Dr. B. Niklasson) ausgewählt:

|                     |   |
|---------------------|---|
| LV-sense-Primer     | 5'-gCggTCCC <u>A</u> CTCTTCACAg-3' (255-274 nt) |
| LV-antisense-Primer | 5'-gCCCAgAggCTAgTgTTACCA-3' (442-424 nt)        |
| LV-MGBc-Sonde       | 5'-TgTCC <u>A</u> gAggTgAAAgC-3' (306-290 nt)   |
| LV-MGBg-Sonde       | 5'-TgTC <u>g</u> AgAggTgAAAgC-3' (306-290 nt)   |

Die Sonden waren am 5'-Ende mit dem Reporterfarbstoff FAM und am 3'-Ende mit einem MGB gekoppelt und wurden über Applied Biosystems, Warrington, Cheshire, UK bezogen. Sie unterschieden sich jeweils an der nt-Position 302, welche einen Polymorphismus manifestiert. Dies ermöglicht eine erste Differenzierung der in Betracht kommenden schwedischen bzw. nordamerikanischen LV-Typen.

2.2.16.2 RT-PCR für den Nachweis von Ljunganviren

Die cDNA-Synthese wurde wie oben erwähnt [Kap. 2.2.4.1] nach dem RT-Ansatz II bei 60 °C (T<sub>m</sub>) mit dem antisense-Primer durchgeführt. Die im Anschluss folgende konventionelle PCR war wie folgt:

| PCR für Nachweis von LV-cDNA |           |                      |  |
|------------------------------|-----------|----------------------|--|
| Assay-Zusammensetzung        |           | Reaktionsbedingungen |  |
| cDNA-Probe                   | 5,0 µl    | 35 PCR-Zyklen        | 30 sec bei 94 °C                           |
| 10x Taq-Puffer               | 2,5 µl    |                      | 30 sec bei 60 °C                           |
| dNTPs [2 mM]                 | 1,25 µl   |                      | 45 sec bei 72 °C                           |
| MgCl <sub>2</sub> [50 mM]    | 0,75 µl   |                      |  |
| Primer (je 25 µM)            | je 0,5 µl |                      | Finale Elongation                          |
| Taq-Polymerase [5 U/µl]      | 0,1 µl    |                      |  |
| Molekularwasser              |           | ad 25,0 µl           | Thermozykler:<br>Biometra TRIO Thermoblock |

Die Größe des hieraus entstehenden Amplifikats ist durch die Primer festgelegt und beträgt 187 bp.

2.2.16.3 Klonierung von PCR-Produkten, Amplifikation und Plasmidisolierung

Für die Sensitivitätsüberprüfung der real-time PCR und der Herstellung einer Standardkurve wurden PCR-Produkte, die in der RT-PCR zuvor mit der RNA-Standardkontrolle des LV-Prototyps 87-012 generiert worden sind, kloniert. Für die Klonierung der frisch erzeugten 187 bp-Amplifikate wurde das pcDNA3.1/V5-His TOPO<sup>®</sup> TA Expression Kit (Invitrogen) verwendet. Die Anwendung beruht auf folgendem Prinzip: Die Taq-Polymerase weist eine terminale Transferaseaktivität auf, durch die ein Desoxyadenosin an die 3'-Enden der PCR-Produkte angehängt wird. Der bereits linearisierte TOPO<sup>®</sup> TA Cloning Vektor pcDNA3.1/V5-His hat an seinen 3'-Enden einen Desoxythymidin-Überhang und ist zusätzlich mit Topoisomerase I gekoppelt. Dadurch wird eine schnelle und effiziente Ligation von PCR-Produkten in den Vektor ermöglicht. Es empfiehlt sich, vor der Klonierung die PCR bei der finalen Elongation 10 min statt 3 min laufen zu lassen, damit PCR-Produkte mit längeren poly-A-Schwänzen entstehen.

Für die Klonierungsreaktion wurden jeweils 4 µl PCR-Produkt eingesetzt. Die einzelnen Schritte sowohl für die Klonierungsreaktion als auch für die Transformation der mitgelieferten chemisch kompetenten One Shot® TOP10 *Escherichia coli*-Bakterien (Invitrogen) erfolgten gemäß den Angaben des Herstellers. Die transformierten Zellen wurden auf vorgewärmten LB-Agarplatten (mit 1,5 % w/v Agar) mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Der Nachweis, dass das gewünschte Fragment in den nach der Klonierung entstandenen Plasmidkonstrukten vorhanden ist, erfolgte mit Hilfe der sog. Kolonie-PCR unter Verwendung der mitgelieferten Plasmidprimer T7 und BGHrev (Invitrogen). Hierbei wurden pro Platte ca. 10 Einzelkolonien gepickt und in 50 µl aq bidest. überimpft. Hieraus wurden je 5 µl entnommen, um 50 µl LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin als Stock anzupfropfen. Die restliche wässrige Zellsuspension wurde gemischt und 5 min bei -80 °C inkubiert. Nach Antauen der Proben wurden die Reaktionsgefäße wiederum gemischt und 5 min bei 100 °C aufgeköcht. Durch diese Kälte- und Hitzeschockbehandlung werden die Plasmide aus den Bakterien isoliert. Schließlich wurde nochmals gemischt und kurz vor Gebrauch der Plasmid-Lösung wurden die Zellreste herunterzentrifugiert. Vom Überstand wurden 2,5 µl direkt in folgendem PCR-Ansatz eingesetzt:

| <b>Kolonie-PCR</b>           |            |  |                  |
|------------------------------|------------|--|------------------|
| <b>Assay-Zusammensetzung</b> |            | <b>Reaktionsbedingungen</b>                |                  |
| DNA-Probe                    | 2,5 µl     | Initiale Denaturierung                     | 3 min bei 94 °C  |
| 10x Taq-Puffer               | 2,5 µl     | 35 PCR-Zyklen                              | 30 sec bei 94 °C |
| dNTPs [10 mM]                | 0,5 µl     |  | 30 sec bei 64 °C |
| MgCl <sub>2</sub> [50 mM]    | 0,75 µl    |  | 60 sec bei 72 °C |
| Primer (je 25 µM)            | je 0,5 µl  |  |                  |
| Taq-Polymerase [5 U/µl]      | 0,2 µl     | Finale Elongation                          | 3 min bei 72 °C  |
| Molekularwasser              |            | Thermozykler:<br>Biometra TRIO Thermoblock |                  |
|                              | ad 25,0 µl |  |                  |

Erwartet wurde ein Plasmid-Amplifikat, das um das entsprechende LV-Insert vergrößert wurde, also von 265 bp auf 452 bp. Die entsprechenden Fragmente wurden aus dem Gel extrahiert und mit T7 bzw. BGHrev ansequenziert, um mittels Sequenz-

analyse die endgültige Bestätigung zu erhalten, dass das gewünschte LV-Insert im Plasmid enthalten war.

Für die Plasmidgewinnung aus den positiven Klonen wurden die jeweiligen Bakterienstocks (50 µl) in 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin zwecks Anreicherung in einer Minikultur überführt und über Nacht bei 37 °C in einem Brutschrank mit Schüttler bei 200 UpM inkubiert. Nachdem die Kulturen ihre stationäre Wachstumsphase erreicht hatten, wurden die Plasmide mit Hilfe des QIAGEN® Plasmid Mini Kit gemäß Herstellerangaben isoliert.

Die Plasmid-Konzentration wurde photometrisch (in µg/ml) gemessen und die Plasmidzahl pro µl folgendermaßen errechnet:

$$\begin{aligned}
 & \text{Plasmid: } 5523 \text{ bp} + 187 \text{ bp} = 5710 \text{ (Vektor + Insert)} \\
 & 5710 \text{ bp} \times 650 \text{ g/bp} = 3711500 \text{ g (1 mol Plasmid)} \quad \begin{array}{l} \downarrow \\ \text{geteilt durch} \\ \text{die} \\ \text{Avogadrozahl} \end{array} \\
 & 3711500 / 6,023 \times 10^{23} = 6,1611323 \times 10^{-18} \text{ g (1 Plasmid)} \\
 & 1 \text{ Plasmid} / 6,1611323 \times 10^{-18} \text{ g} = x / \text{gemessene Konzentration} \times 10^{-9} \\
 & x = \text{Plasmidzahl} / \mu\text{l}
 \end{aligned}$$

Mit einer 10-fach Verdünnungsreihe des Insert-Plasmids konnte die Sensitivität der quantitativen real-time PCR für LV überprüft und die Standardkurve erstellt werden.

#### 2.2.16.4 Quantitative real-time RT-PCR für den Nachweis von Ljunganviren

Die cDNA-Synthese wurde wie oben erwähnt [Kap. 2.2.4.1] nach dem RT-Ansatz II bei 60 °C (T<sub>m</sub>) mit dem antisense-Primer durchgeführt. Die im Anschluss folgende quantitative real-time PCR war wie folgt:

quantitative real-time PCR für LV-Nachweis

| Assay-Zusammensetzung     |            | Reaktionsbedingungen                             |                  |
|---------------------------|------------|--|------------------|
| cDNA-Probe                | 2,5 µl     | UDG-Behandlung                                   | 2 min bei 50 °C  |
| 10x Taq-Puffer+ROX        | 2,45 µl    | Initiale Denaturierung                           | 10 min bei 95 °C |
| dNUTPs [2,5 mM]           | 2,0 µl     |  |                  |
| MgCl <sub>2</sub> [25 mM] | 4,0 µl     | 35 PCR-Zyklen                                    | 15 sec bei 95 °C |
| Primer (je 10 µM)         | je 0,5 µl  |  | 30 sec bei 60 °C |
| Taq-Polymerase [100 U/µl] | 0,25 µl    | Thermozykler:                                    |                  |
| Sonde (je 10 µM)          | je 0,25 µl | ABI Prism <sup>®</sup> 7700 Sequence Detector    |                  |
| UDG [100 U/µl]            | 0,25 µl    | ABI Prism <sup>®</sup> 7900 HT Sequence Detector |                  |
| Molekularwasser           | ad 25,0 µl |  |                  |

### 2.2.17 Statistische Analysen

Sämtliche Befunddaten wurden in Microsoft Excel tabellarisch festgehalten und mit EpiInfo 6 statistisch analysiert. Hierbei wurden deskriptive statistische Standard-techniken angewendet. Der Vergleich kontinuierlicher Variablen zwischen den zwei untersuchten Patientengruppen wurde mit dem Student-t-Test für Variable mit normaler Verteilung durchgeführt. Ergebnisse kategorischer Variablen wurden als Anteile mit einem 95 %-Konfidenzintervall dargestellt und mit dem Chi Quadrat- ( $\chi^2$ )-Test nach Maentel Haenszel analysiert. Bei kleineren Stichproben wurde der Fisher-Exakt-Test angewendet. P-Werte  $\leq 0,05$  wurden als statistisch relevant angezeigt.