

II

Materialien

II.1 Antibiotika

Ampicillin (Natriumsalz)	MP Biomedicals, Eschewege
Ciprofloxacin	MP Biomedicals, Eschewege
Geneticin (G418)	Sigma, Taufkirchen
Kanamycin	MP Biomedicals, Eschewege
Penicillin/Streptomycin (PenStrep)	Invitrogen, Karlsruhe

II.2 Primär Antikörper

Antikörper	Herkunft	Firma	Verdünnung
anti-HA-tag	Kaninchen	Sigma, Taufkirchen	WB: 1:1000
anti-HIS	Maus	Qiagen, Hilden	WB: 1:1000
anti-HCV-NS5A	Maus	Biogenesis, Berlin	WB: 1:2000
anti-HCV-NS5A	Maus	IBT, Reutlingen	WB: 1:2000
anti-HCV-NS5A	Kaninchen	T. Buerckstuemmer, RKI	WB: 1:1000
anti-ISGF3	Maus	Becton Dickinson, Heidelberg	WB: 1:250
anti-STAT1	Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg	WB: 1:1000
anti-pSTAT1(A-2)	Maus	Santa Cruz, Heidelberg	WB: 1:250
anti-STAT2(c20)	Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg	WB: 1:1000
anti- α -Tubulin	Maus	Sigma, Taufkirchen	WB: 1:1000

II.3 Sekundär Antikörper

Antikörper	Herkunft	Firma	Verdünnung
anti-Mouse-POD	Kaninchen	Dako Cytomation, Hamburg	WB: 1:2000
anti-Rabbit-POD	Ziege	Perbio Science, Bonn	WB: 1:20,000

II.4 Chemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agar	Becton-Dickinson, Heidelberg
Agar Neeo Ultra	Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Roth, Karlsruhe
Oxoid-Agar	Oxoid, Wesel
Albumin Fraktion V	Sigma, Taufkirchen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Feinchemie K.-H. Kallis KG
BSA (Rinderserumalbumin)	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Coomassie Roti-Blue	Roth, Karlsruhe
DEAE-Dextran	Serva, Heidelberg
Dimethylformamid (DMF)	Serva, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen
Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs)	Serva, Heidelberg
Dithiothreitol (DTT)	Serva, Heidelberg
Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Formamid	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd 10 % (Methanol-frei)	Polysciences, USA
Geneticin (G418) Disulfatsalz	Sigma, Taufkirchen
Glycerin	Serva, Heidelberg
Glycin	Serva, Heidelberg
Glykogen	Roche, Karlsruhe
α -D(+)-Glucose	Roth, Karlsruhe
Gluthatione Sepharose 4B	Amersham Biosciences, Freiburg
4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin- Ethansulfonsäure (HEPES)	Roth, Karlsruhe
Isopropyl- β -Thiogalactopyranidose (IPTG)	Roche, Mannheim
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kalium-dihydrogen-orthophosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth, Karlsruhe

Kristallviolett	Roth, Karlsruhe
Lithiumacetat (LiAc)	Roth, Karlsruhe
Lipofectamin 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver (Sucofin)	EDEKA, Berlin
Manganchlorid (MnCl ₂)	Roth, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
MES Kaliumsalz (2-Morpholinoethansulfonsäure-Monohydrat)	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Mowiol 4-88	Calbiochem, Bad Soden
Natriumacetat (NaAc)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Riedel-de Haën, Seelze
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Riedel-de Haën, Seelze
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Nonidet P40 (NP40)	Sigma, Taufkirchen
<i>o</i> -Nitrophenyl- β -D-Galactopyranoside (ONPG)	MP Biomedicals, Eschewege
Phenol	Roth, Karlsruhe
PEG (Polyethylenglykol) 1000	Roth, Karlsruhe
PEG 4000	Fermentas, St.Leon-Rot
2-Propanol	Fisher Scientific, Schwerte
Ponceau S	Serva, Heidelberg
Rotiphenol [25:24:1] (Phenol/Chloroform/Amylalkohol)	Roth, Karlsruhe
Rubidiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Sulfosalicylsäure	Merck, Darmstadt
SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate	Perbio Science, Bonn
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
N,N,N'N'-Tetraethylmethyldiamin (TEMED)	FERAK, Berlin
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt
Tris (Trishydroxymethylaminomethan)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	FERAK, Berlin
TRIZOL®	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin/EDTA	Invitrogen, Karlsruhe

TPCK-Trypsin (L-1-Tosylamido-2-Phenylethyl-Chloromethyl- Keton)	Sigma, Taufkirchen
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
X-Gal (5-Chlor-4-Brom-3-indolyl- β -D-Galactosid)	Roche, Mannheim

II.4.1 Standard Puffer und Lösungen

Acrylamid/Bis	48 % (w/v) Acrylamid 1,5 % (w/v) Bisacrylamid
DNA-Ladepuffer (6x)	0,1 % (w/v) Bromphenolblau 0,1 % (w/v) Xylenzanol 30 % Glycerin
FSB-Puffer	10 mM KMes pH 7.0 50 mM CaCl ₂ 45 mM MnCl ₂ 100 mM RbCl 10 % Glycerol in aqua dest. steril filtriert
GST-Präzipitationspuffer	20 mM HEPES, pH 8,0 150 mM NaCl 0,05 - 0,5 % NP40
Magnesium-Stock	1 M MgCl ₂ 1 M MgSO ₄
Nukleärer Extraktionspuffer (NEB)	420 mM KCl 20 mM HEPES 1 mM EDTA 20 % Glycerol 0,1 mM Vanadat (Alexis) 0,1 mM PMSF 1 mM DTT 1 Pille <i>complete protease inhibitor</i> (Roche) pH 7,6

Oligo-Puffer	10 mM MgCl ₂ 50 mM KCl 20 mM Tris-HCl pH 7,5
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 80,9 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4 (HCl)
PBS/BA/Mg ²⁺ /Ca ²⁺	0,1 g/l MgCl ₂ 0,1 g/l CaCl ₂ 0,2 % Bovines Serumalbumin in PBS
Ponceau-S-Lösung	7 % Trichloressigsäure 0,1 % Ponceau
Rapid Ligation Puffer (2x)	60mM Tris-HCl (pH 7.8) 20 mM MgCl ₂ 20mM DTT 2mM ATP 10 % PEG.
RIPA Puffer	50 mM Tris, pH 8,0 150 mM NaCl 1 % NP40 0,5 % Na-Desoxycholat 0,1 % SDS frisch zugegeben: 1 mM PMSF 0,5 % Aprotinin 1 mM Na-Vanadat 5 mM Benzamidin 0,5 mM DTT 10 mM Na-Fluorid 50 mM Natriumglycerophosphat
SDS-Gellaufpuffer (10x)	250 mM Tris 1,92 M Glycin 10 g/l SDS

SDS-Ladepuffer (2x)	0,1 M Tris, pH 6,8 4 % (w/v) SDS 20 % Glycerin 5 % β -Mercaptoethanol eine Spatelspitze Bromphenolblau
SemiDryBlot-Puffer	48 mM Tris 39 mM Glycin 1,3 mM SDS 20 % Methanol
Shift Puffer	100mM HEPES 20 % Ficoll 400 5 mM $MgCl_2$ 200 mM KCl 0,5 mM EGTA 2,5 mM EDTA
SSC (20x)	3 M NaCl 0,3 M Na-Zitrat
Strip Puffer	62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8) 2% SDS 100 mM β -Mercaptoethanol
TAE (50x)	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA, pH 8,0
TBS (10x)	0,1 M Tris-HCl, pH 8,0 0,15 M NaCl
TBS-T (10x)	10 x TBS + 0,5 % Tween 20
TBE (10x)	0,89 M Tris 0,89 M Borsäure 10 mM EDTA, pH 8,0
TE (10x)	0,1 M Tris, pH 8,0 10 mM EDTA, pH 8,0

Zytoplasmatischer Extraktionspuffer (CEB)	10 mM KCl 20 mM HEPES 0,2 % NP-40/IGEPAL 1 mM EDTA 10 % Glycerol 0,1 mM Vanadat (Alexis) 0,1 mM PMSF 1 mM DTT 1 Pille <i>complete protease inhibitor</i> (Roche) pH 7,4
---	--

II.5 DNA-modifizierende Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIAP)	Fermentas, St.Leon-Rot
Hotstar DNA-Polymerase	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase)	Invitrogen, Karlsruhe
Restriktionsenzyme	Fermentas, St.Leon-Rot
RNasin	Promega, Mannheim
Superscript II TM Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
T4-DNA-Ligase	Fermentas, St.Leon-Rot
Taq-Polymerase	Invitex, Berlin
TaKaRa LA Taq-Polymerase	Mobitec, Göttingen

II.6 Sonstige Enzyme

IFN- α (human)	Chemicon, Hofheim TebuBio, Offenbach
IFN- β (human)	Chemicon, Hofheim TebuBio, Offenbach
IFN- γ (human)	Chemicon, Hofheim

II.7 Radiochemikalien

$\alpha^{32}\text{P}$ -dGTP	MP Biomedicals, Eschewege
$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP	MP Biomedicals, Eschewege
$\alpha^{32}\text{P}$ -dATP	MP Biomedicals, Eschewege
$\alpha^{32}\text{P}$ -dTTP	MP Biomedicals, Eschewege

II.7.1 Sonstiges

DNA-Längenstandards	Roche, Mannheim; Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
DNA-Sequenzier-Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt
Endofree Plasmid-Maxi-Kit	Qiagen, Hilden
Filterpapier 3MM (Whatmann)	NeoLab, Heidleberg
Kulturgefäße (Plastik)	Greiner, Solingen; Nunc, Dänemark; Sarstedt, Nümbrecht
Luciferaseassay-Kit	Promega, Mannheim
MinElute PCR-Purification-Kit;	Qiagen, Hilden
Nitrozellulose-Membran	Schleicher & Schuell, Dassel
Nucelobond Folded Filters	MACHEREY-NAGEL, Düren
Parafilm	American National Can., USA
Prestained Protein-Marker	NE Biolabs, Schwalbach
QIAamp Viral-RNA-Mini-Kit	Qiagen, Hilden
QIAEXII Gel-Extraction-Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid-Maxi-Kit	Qiagen, Hilden
QIAPREP Plasmid-Mini-Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen OneStep RT-PCR-Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel-Extraction-Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR-Purification-Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Protection-Kit	Qiagen, Hilden
Röntgenfilm BioMax MR-1 18 x 24	Kodak, Stuttgart
TNT-coupled Reticulocyte Lysate System	Promega, Mannheim
TOPO XL PCR-Cloning-Kit OneShot	Invitrogen, Karlsruhe

II.8 Zellkultur

Accutase	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Bovines Serumalbumin (35 %)	MP Biomedicals, Eschewege
DMEM high glucose	MP Biomedicals, Eschewege
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen
Fötale Kälberserum - Gold (FCS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching
L-Glutamine	Invitrogen, Karlsruhe
MEM (Eagle Salz; ohne Zusätze)	MP Biomedicals, Eschewege
MEM (Earl Salz; mit L-Glutamin; ohne NaHCO ₃)	Invitrogen, Karlsruhe
Zellkultur Flaschen T75	Renner GmbH, Dannstadt

II.9 Medien & Puffer

Nährmedien für die Bakterienkultivierung, sowie Zellkulturmedien wurden zentral am RKI hergestellt.

II.9.1 Medien für Bakterienkulturen

LB-Medium	10 g/l Trypton 5g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl pH 7.2
2 x YT-Medium	16 g/l Trypton 10 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl pH 7.2
SOB-Medium	20 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl
SOC-Medium	20 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl autoklaviert und 20 mM Magnesium 0,4 % (w/v) Glukose (sterilfiltriert)

Bei Bedarf wurden den Medien nach dem Autoklavieren folgende Antibiotika zugesetzt:

- Ampicillin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (sterilfiltriert)
- Kanamycin 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (sterilfiltriert)

Zur Herstellung fester Nährböden wurde den Medien 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt. Optional wurden für das Blau-Weiß-Screening 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ X-Gal und 0,1 mM IPTG dem Medium beigegeben.

II.9.2 Medien für Zellkultur

Die Zellkulturmedien DMEM und MEM wurden frisch versetzt mit 10 % FCS 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml PenStrep. Abweichend davon wurden Medien für Transfektionsansätze (Transfektionsmedium) nicht mit Antibiotika versetzt. Medien für Infektionsexperimente wurden an Stelle von 10 % Serum, mit 0,1 % FCS oder 0,2 % BSA versetzt.

II.10 Plasmide

II.10.1 Expressionsvektoren

Vektor	Beschreibung
pcDNA TM 3.1/V5-His	Expressionsvektor zur Klonierung von PCR Fragmenten mit CMV und T7 Promotor, Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA-M27	M27-Expressionsvektor, mit freundlicher Genehmigung von Prof. H. Hengel, Institut für Virologie, Düsseldorf
pcDNA-NS5A-(Pat. Id.-Klon) ^a pcDNA-VP35	HCV-NS5A Expressionsvektor VP35-Expressionsvektor, mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. E. Mühlberger, Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS	Eukaryontischer Expressionsvektor mit beta-Actin-Promotor, mit freundlicher Genehmigung von Prof. J.-I. Miyazaki, Osaka University Medical School, Japan (Niwa et al., 1991).
pCAGGS-NS5A-(Pat. Id.-Klon) ^a pCAGGS-NS1	pCAGGS mit eingefügtem HCV-NS5A-Gen. pCAGGS mit eingefügtem Influenza A/WSN/33 NS1-Gen, mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. T. Wolff, Robert Koch-Institut, Berlin

^a *Pat. Id.* entspricht einer sechsstelligen Nummer (z.B. 108414) und codiert einen Patienten aus dem das entsprechende Gen isoliert wurde. *Klon* entspricht einem Kürzel aus Buchstabe und Zahl (z.B. D2) und dient zur Unterscheidung verschiedener Gene einer Quasispezies.

II.10.2 Reporterplasmide

Vektor	Beschreibung
p-125-Luc	Luciferase-Reporter für den IFN- β -Promotor (Yoneyama et al., 1996)
p-125-Luc ^{neo}	p-125-Luc plus Neomycin-Resistenz-Gen, mit freundlicher Genehmigung Khanh Le, Institut für Virologie, Düsseldorf
pISRE-Luc	Luciferase-Reporter für den ISRE-Promotor, BD Biosciences, Heidelberg
pGAS-Luc	Luciferase-Reporter für den GAS-Promotor, Stratagene, Amsterdam
pCMV- β GAL	Betagalaktosidase-Reporter mit CMV-Promotor, mit freundlicher Genehmigung PD. Dr. T. Wolff, RKI

II.11 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von der Firma Biotex (Berlin) bezogen. Die Erkennungsstellen der entsprechenden Restriktionsendonuklease sind im Folgenden als **Fettdruck** gekennzeichnet und die zur Transkription verwendeten Start- bzw. STOP-Codons entsprechend unterstrichen.

II.11.1 Kommerzielle Oligonukleotide

Name	s/as	Sequenz (5'→3')
BGH	as	TAGAAGGCACAGTCGAGG
GPO-3	s	GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT
MGSO	as	TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC
SP6	as	ATTTAGGTGACACTATAG
T7	s	TAATACGACTCACTATAGGG

II.11.2 HCV-Oligonukleotide

HCV-	s/as	Sequenz (5'→3')
ROTH-1	s	ACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGT
ROTH-2	as	TCCCGGGGCACTCGCAAGCACCCCTATCAGG
1b	as	GGTGCACGGTCTACGAGACC
38	s	CCYTGGWTSACACCYAGGTGCVTGGT
56	s	GAGGAACTACTGTCTTCACGCAGAA
172	as	GTGGTGACGCAGCAARGAGT
173	s	GAGGGGGCTGTGCAGTGGATG
174	as	TGAGCAGCAGACGACGTCCTC
175	s	<u>ATGGGCTCCGGCTCGTGGCTAARGGA</u>
190	s	CCG CAATTG <u>ACCAT</u> GGGCTCCGGCTCGTGGC
191	as	CG CAATTG <u>TCAT</u> GAGCAGCAGACGACG
192	s	GTCTCYGCCCGAAGGGG
193a	s	GG GAATT <u>CACCAT</u> GGCGCCATYACGGCC
194a	as	GG GAATT <u>CTCA</u> AGTGACGACCTCCAGGTC
195a	as	CCCAGGTGGCTIGTGACGAC
196	as	GCCATCTCYCGGTCC
197	as	G CGAATT <u>CTC</u> AGGCGTAIGCYCGTGGTGG
198	s	G CGAATT <u>CACCAT</u> GAGCGGCGAYTGGCTRCG
199	as	G CGAATT <u>CTC</u> AGCAGCAGACCACGCTCTGCTC
200	s	AGAAYSCCCCACYRCTGAGGACAT
201	as	GGCAGTTTCTCYTCCTCAGCACT
202	s	CACCAGTGGATCAATGAAGAC
203	s	GGGGGAITTCACACTACGTGAC
204	s	CGGCGTGAACATATGCAACAGGG
205	s	G CGAATT <u>GACCAT</u> GAGCGGCGAYTGGCTRCG
206	as	CG CAATTG <u>TCAG</u> CAGCAGACCACGCTCTGCTC
207	s	CC GAATTG <u>ACCAT</u> GCATCATCACCATCACCA-

II.12 Organismen und biologisches Material

II.12.1 Bakterienstämme

Top10	[F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>)φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (StrR) <i>endA1</i> <i>nupG</i>]
XL1-Blue	[<i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i> <i>supE44</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> [F' <i>pro AB lac^qZ</i> Δ <i>M15</i> <i>Tn10</i> (Tet ^r)]]

II.12.2 Eukaryontische Zelllinien

293 ^a	Endothele Nieren-Zelle des Menschen
293T ^{ab}	Endothele Nieren-Zelle des Menschen
Huh7	Humanes hepatozelluläres Leber-Karzinom
MDCK2	(Mardin Darby <i>canine kidney cells</i>) Nieren-Zelle des Hundes

a immortalisiert mit Adenovirus Typ 5 [Ad5; strain F2853-5b] (DuBridgde et al., 1987).

b transfiziert mit dem Temperatur-sensitiven Simian-Virus-40 (SV40) „T antigen“.

II.12.3 Patientenseren

Seren von Patienten mit CHC wurden im Rahmen von Klinischen Studien von unserem Kooperationspartner PD. Dr. T. Berg (Charité, Campus Virchow-Klinikum) asserviert. Die CHC wurde über einen Zeitraum von mindestens 6 Monaten durch erhöhte Transaminasen und konsistent nachweisbare Mengen an HCV-RNA im Serum diagnostiziert. Die untersuchten Patienten waren anti-HCV positiv und negativ auf das Hepatitis B Oberflächen-Antigen bzw. die Humanen Immundefizienz-Viren HIV-1 und HIV-2. Die HCV-Genotypisierung erfolgte durch Reverse Hybridisation (Inno LiPA HCV-II, Innogenetics, Gent, Belgium). Alle Patienten wurden in angehenden klinischen Studien entweder mit der Standard-Kombinationstherapie (IFN-alpha und Ribavirin) oder mit pegyliertem IFN-alpha (PEG-IFN-alpha und Ribavirin) für 24 Wochen bei Genotypen 2/3 bzw. 48 Wochen bei Genotyp 1 behandelt. Eine SVR wurde definiert durch eine negative qualitative PCR 24 Wochen nach Therapie. Die Patientendaten wurden aus Datenschutzgründen codiert und liegen als sechsstelliger Nummerncode vor. Die Viruslast wurde mittels quantitativer PCR vor Therapie (t₀), sowie 2, 12 und 20 Wochen nach Therapie bestimmt (t₂, t₁₂ und t₂₀).

II.12.4 Viren

Die Influenza-Viren A/PR8/34 und delNS1 wurden von PD Dr. T. Wolff (Robert Koch-Institut, Berlin) zur Verfügung gestellt.

III

Methoden

Die hier aufgeführten molekularbiologischen Methoden wurden, soweit nicht gesondert zitiert, aus (Sambrook und Russell, 2001) entnommen.

III.1 Nukleinsäuretechniken

III.1.1 Präparation von Nukleinsäuren

DNA-Präparation

Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde unter Verwendung verschiedener Kits präpariert. Die Plasmidisolierung im kleinen Maßstab erfolgte aus 2 ml Kulturen mit Hilfe des Miniprep-Kits (Qiagen, Hilden), für die Isolierung größerer Mengen wurden 250 ml Kulturen mit dem Maxiprep-Kit (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Zur Herstellung endotoxinfreier DNA wurde das Endofree-Kit (Qiagen, Hilden) verwendet.

DNA-Fällung

DNA konnte durch die Zugabe von 2,5 Volumen Ethanol (absolut) und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,3) bei -20°C innerhalb von 30 min ausgefällt werden. Bei niedrigen DNA-Mengen wurden 20 µg Glykogen zur besseren Visualisierung des DNA Pellets dazu gegeben. Anschließend erfolgte eine Sedimentierung durch Zentrifugation (14000 rpm, 4°C). Das Salz wurde durch mehrmaliges Waschen mit 70 % Ethanol (w/v) entfernt, der Alkohol dekantiert und die DNA für ca. 7 min im Evaporator getrocknet. Das Pellet wurde in TE-Puffer aufgenommen. DNA wurde bei 20°C gelagert.

Bei geringen Mengen wurde die Isopropanolfällung bevorzugt. Die DNA-Lösung wurde hierbei mit 2,5 Volumen Isopropanol und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,3) versetzt und für 5 min bei Rt inkubiert. Sedimentation, Waschen und Trocknen erfolgte wie bei der Ethanol-fällung.

RNA-Fällung

Die Fällung von RNA erfolgte analog zur DNA-Fällung, standardmäßig mit Isopropyl Alkohol. Hier konnte durch Zugabe von 1/10 Volumen 2 M Kaliumacetat (pH 5,6) und 20 µg Glycogen im Einzelfall die Effizienz verbessert werden. Nach 10 min Inkubation bei

Rt wurden die Proben bei 4°C 10 min (14000 rpm) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und bei 4°C 5 min (14000 rpm) zentrifugiert. Das Pellet wurde ca. 7 min im Evaporator getrocknet und in deionisiertem Wasser aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA und RNA

Um Proteine, insbesondere Enzyme mit störenden Aktivitäten, aus wässrigen Nukleinsäurelösungen zu entfernen, wurden die Nukleinsäuren zunächst mit Phenol/Chloroform extrahiert. Dabei wurden die Nukleinsäurelösungen zu einem Volumen von mindestens 200 μ l mit aqua dest. aufgefüllt und mit einem Volumen Phenol ausgeschüttelt (Sambrook und Russell, 2001). Die Proteine gelangen dabei in die Phenol- oder Interphase. Die Phasentrennung wurde durch Zentrifugation (14000 rpm, Rt) beschleunigt. Die Nukleinsäure verblieb in der oberen wässrigen Phase. Durch zweimaliges Ausschütteln mit 1,5 Volumen Chloroform wurde das restliche Phenol aus der wässrigen Phase entfernt. Nach der erneuten Phasentrennung wurde die Chloroform-Phase abpipettiert und die Nukleinsäure durch eine Fällung gereinigt und konzentriert.

Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Absorptionsmaxima liegen für Nukleinsäuren im UV-Bereich bei etwa 260 nm. Die Konzentration von DNA- und RNA-Lösungen konnte mit einem Spektrophotometer (UVicon 930, Kontron Instruments) bestimmt werden. Die Messung erfolgte nach geeigneter Verdünnung in aqua dest.. Eine $OD_{260} = 1$ entspricht bei ssDNA 37 μ g/ml, bei RNA 40 μ g/ml und bei dsDNA einer Konzentration von 50 μ g/ml (Sambrook und Russell, 2001).

III.1.2 Enzymatische Reaktionen

Alle enzymatischen Reaktionen wurden, soweit nicht spezifisch angegeben, gemäß den jeweiligen Herstellerangaben durchgeführt.

Spaltungen von DNA mit Restriktionsenzymen

Zur Analyse und Klonierung wurde Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen, die spezifische Sequenzen in doppelsträngiger DNA erkennen, gespalten. In der Regel wurden 1 μ g DNA 1 h bei 37°C inkubiert. Zur weiteren Bearbeitung wurde die DNA mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol gefällt. Geschnittene DNA wurde zur weiteren Bearbeitung bei -20°C gelagert.

Dephosphorylierung

In linearisierte Plasmide lassen sich nur schwer DNA-Fragmente einsetzen, da diese präferentiell zurückligieren. Um dies zu verhindern, wurden die 5'-Phosphate der Plasmid-DNA mit alkalischer Kälberphosphatase CIAP (Fermentas GmbH, St.Leon-Rot) dephosphoryliert. Im Anschluss an die Dephosphorylierung erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion zur Inaktivierung der Phosphatase sowie eine Fällung mit Ethanol.

Verknüpfung von DNA-Fragmenten „Ligation“

Die T4-DNA-Ligase katalysiert mit Hilfe von ATP und Mg^{2+} -Ionen die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe und der 3'-Hydroxylgruppe von DNA-Molekülen. Für die Ligation wurden etwa 100–500 ng DNA pro Reaktionsansatz in 1 x *Rapid Ligation Puffer* mit 1 U T4-DNA-Ligase (Fermentas GmbH, St.Leon-Rot) eingesetzt. Hierbei wurde beachtet, dass ein mindestens dreifacher molarer Überschuss an Insert-DNA gegenüber Vektor-DNA vorlag. Der Vektor wurde grundsätzlich dephosphoryliert. Die Ligationsreaktion erfolgte entweder über Nacht bei 16°C oder für 15 min bei Rt.

Herstellung glatter Enden an DNA-Molekülen

Auffüllen von 5'-Überhängen mit Klenow

Für die Ligation nicht-kompatibler Enden nach Restriktionsenzymspaltung ist es notwendig, glatte Enden herzustellen. Hierzu wurde das große Fragment der DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) verwendet, dem die 5'→3'-Exonukleaseaktivität fehlt. Mit Hilfe der noch vorhandenen 3'→5'-Exonuklease- und der 5'→3'-Polymeraseaktivität können nicht-kompatible Enden durch Auffüllen des 5'-Überhangs in glatte Enden (*blunt ends*) umgewandelt werden.

Die DNA wurde in einer Konzentration bis zu 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in 1 x Klenow Puffer gelöst und mit einer Einheit Klenow-Fragment (Fermentas GmbH, St.Leon-Rot) pro μg DNA bei 37°C 15 min mit dNTPs (je 125 μM dATP, dCTP, dGTP und dTTP) inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-fällung durchgeführt.

Abbau von 3'-Überhängen mit T4-DNA-Polymerase

Analog zum Auffüllen von 5' Überhängen wurde die T4-DNA-Polymerase zur Herstellung glatter Enden aus 3' Überhängen eingesetzt.

Die DNA wurde in einer Konzentration bis zu 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in 1 x T4-DNA-Polymerase Puffer gelöst und mit einer Einheit T4-DNA-Polymerase (Fermentas GmbH, St.Leon-Rot) pro μg DNA bei 37°C 1 h mit dNTPs (je 125 μM dATP, dCTP, dGTP und dTTP) inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-fällung durchgeführt.

III.1.3 Nukleinsäureamplifikation

Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente mittels PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) dient der enzymatischen Amplifikation eines durch spezifische Oligonukleotide definierten linearen DNA-Abschnitts. Die Amplifikation wird durch sequentielles Denaturieren, Hybridisieren und Elongieren erreicht. Die Hybridisierungstemperatur variiert dabei in Abhängigkeit der Länge und Komplementarität der Oligonukleotide: Die Synthesedauer ist abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes. Alle Polymerasen wurden gemäß den Herstellerangaben eingesetzt.

Im folgenden ist ein beispielhaftes Syntheseprotokoll angegeben.

Standard PCR Protokoll:

1-10 ng	DNA-Matrize
2,5 μ l	10 x Puffer (Eppendorf, Hamburg)
0,75 μ l	MgCl ₂ [50 mM] (1,5 mM)
0,5 μ l	dNTPs [10 mM]
0,5 μ l	sense-Primer [25 μ M]
0,5 μ l	antisense-Primer [25 μ M]
0,1 μ l	Taq-Polymerase [5 U/ μ l] (Invitek, Berlin)

ad 25 μ l aqua dest.

Thermocycler Einstellungen:

Temp.	Zeit	Zyklen
94°C	2 min	
94°C	15 s	} 25 \odot
42–72°C	30 s	
72°C	1 min	
72°C	7 min	
4°C	∞	

Zur Verbesserung der Amplifikation kamen auch die HotStar-Taq (Qiagen, Hilden) und die TaKaRa LA Taq (Mobitec, Göttingen) zum Einsatz. Die HotStar-Taq wird erst durch einen initialen Hitzeschritt aktiviert (95°C 15 min), sie ist effizienter bei der Amplifikation geringer DNA-Mengen, hohem GC-Gehalt bzw. starker Sekundärstruktur. Die TaKaRa LA Taq hat gemäß Herstellerangaben eine 10–100 fache Ausbeute und eine 4–6 fach geringere Fehlerrate im Vergleich zur einfachen Taq und liest auch lange GC-reiche Matrizen.

Zur Erhöhung der Spezifität, insbesondere bei der Amplifikation aus dem HCV-Genom, wurde eine „*nested-PCR*“ durchgeführt. Das Prinzip der *nested-PCR* beruht auf zwei ineinander verschachtelten PCRs, wobei die Primer der ersten PCR in einem konservierten Bereich binden und einen bestimmten Bereich aus einem Pool hervorheben, aus dem dann in der zweiten PCR ein spezifischer Bereich amplifiziert wird. Beide PCRs wurden standardmäßig in einem Volumen von 25 μ l durchgeführt. Zur ersten PCR wurden 2,5 μ l der cDNA und zur zweiten PCR 1 μ l des Produktes der ersten PCR dazugegeben.

Die Amplifikation spezifischer RNA-Fragmente mittels RT-PCR

Zur Amplifikation von RNA wird diese zunächst mittels Reverser-Transkriptase (RT) umgeschrieben, die so gewonnene komplementäre DNA (cDNA) kann dann in einer gewöhnlichen PCR amplifiziert werden. Für die RT-PCR wurde die Reverse-Transkriptase *M-MLV* bzw. *Superscript IITM* gemäß Herstellerangaben verwendet. Die *Superscript IITM* ist effizienter bei der Amplifikation kleinerer Mengen RNA und ist im Gegensatz zur *M-MLV* in der Lage, große Fragmente (gemäß Herstellerangaben bis 12,3 kb) umzuschreiben.

Die RNA aus Patientenserum oder Zellkultur wurde standardmäßig mit dem Viral-RNA-Kit (Qiagen, Hilden) aufgearbeitet und in 60 μ l AVL Puffer aufgenommen. Größere Mengen wurden über TRIzol aufgereinigt und gefällt. Alle RNAs wurden bei -80°C gelagert.

Standard PCR Protokoll:

5 μ l	gereinigte RNA in AVL
2 μ l	5 x RT Puffer (Qiagen, Hilden)
0,5 μ l	dNTPs [10 mM]
0,5 μ l	DTT [0,1 M]
0,5 μ l	antisense-Primer [25 μ M]
0,25 μ l	RNAsin [40 U/ μ l]
0,25 μ l	M-MLV [200 U/ μ l] oder Superscript II TM [200 U/ μ l]
ad 10 μ l aqua dest.	

Thermocycler Einstellungen:

	Temp.	Zeit
	42°C	5 min
M-MLV	37°C	20 min
Superscript II TM	37°C	55 min
	94°C	5 min
	4°C	∞

Alternativ wurde auch das OneSTEP-Kit von Qiagen verwendet, bei dem ein Enzymmix zum Einsatz kommt, so dass RT und PCR nacheinander, in einem Reaktionsgefäß ablaufen können.

Quantitative *Real-Time*-PCR (TaqMan)

Die *Real-Time*-PCR im TaqMan bedient sich einer Oligonukleotid-Sonde, die im Bereich zwischen den beiden Primern sequenzspezifisch an der Matrize bindet. Die Sonde besitzt einen Farbstoff (FAM) am 5' und einen Quencher am 3' Ende (TAMRA). Im Verlauf der Elongation des Produktes trifft die verwendete Taq-Polymerase auf die Sonde, die dann durch die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase gespalten wird, so dass der Reporterfarbstoff von dem Quencher getrennt wird. Sobald ausreichend Farbstoff freigesetzt wurde, ist ein entsprechendes Fluoreszenzsignal messbar. Da diese Messung im TaqMan jeweils während der Elongationsphase eines jeden Zyklus' erfolgt, können Matrizen nicht nur qualitativ sondern auch quantitativ in „Echtzeit“ nachgewiesen werden

Sequenzierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde nach der Didesoxy-Kettenabbruchmethode sequenziert (Sanger et al., 1977). Hierbei werden durch den Einbau von Didesoxynukleotiden statistisch verteilte Kettenabbrüche gesetzt, wodurch alle möglichen Fragmentlängen der Matrize hergestellt werden, die dann mit Hilfe einer hochauflösenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese bzw. einer Kapillare voneinander getrennt gelesen werden können.

Hierzu wurde das *BigDye Terminator Cycle Sequencing*-Kit (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

Standard Protokoll:

300 ng	DNA-Matrize
2 μ l	<i>Big Dye</i> Sequencing Mix (PE Applied Biosystems, Weiterstadt)
5–15 μ mol	Primer
<hr/>	
ad 10 μ l	aqua dest.

Thermocycler Einstellungen:

Temp.	Zeit	Zyklen
94°C	30 s	} 25 \odot
42–54°C	15 s	
72°C	4 min	
<hr/>		
4°C	∞	

Die Hybridisierungstemperatur wurde der Schmelztemperatur des Oligonukleotides angepasst. Überschüssige Farbstoffe wurden je nach später verwendetem Sequenziergerät durch Ethanolfällung (für PAGE-Sequencer ABI 377) oder Aufreinigung über Sephadex-Säulen (Sephadex G-50 Superfine) entfernt.

Die Säulenaufreinigung und die Bedienung der Sequenzierautomaten erfolgte zentral am RKI. Zur Analyse der Sequenzchromatogramme wurde das Programm „Sequencher“ (Version 3.1, Gene Codes Corp, Michigan-USA) eingesetzt.

III.1.4 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Auftrennung von DNA im Agarosegel

Doppelsträngige DNA-Moleküle wurden in 1 % - 1,5 %igen, horizontalen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Als Laufpuffer diente dabei 0,5 x TBE. Die aufzutrennende DNA wurde zuvor mit 1/5 Volumen 6 x DNA-Ladepuffer versetzt. Die Auftrennung erfolgte standardmäßig bei 80 Volt. Durch Zugabe von Ethidiumbromid 0,2 μ g/ml zur Gelmasse wurde die DNA während der Elektrophorese angefärbt und hinterher auf einem Durchlichtschirm mit UV-Licht sichtbar gemacht. Die Dokumentation erfolgte als Thermoprint, sowie digital mit Hilfe eines Videodokumentationssystems (Herolab, Wiesloch).

Isolierung von DNA aus dem Agarosegel

Auf einem UV-Durchlichtschirm wurden Gelbereiche, welche „DNA-Banden“ einer gewünschten Größe enthielten, mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick Gel-Extraction-Kits (Qiagen, Hilden) entsprechend den Herstellerangaben aufgearbeitet.

III.2 Mikrobiologische Methoden

III.2.1 Anzucht von Bakterien

DNA-Transformation in *E.coli* mittels Hitzeschock

Das Protokoll zur DNA-Transformation wurde modifiziert nach (Hanahan et al., 1991).

Herstellung chemisch kompetenter *E.coli* Bakterien Als Vorkultur wurden 5 ml LB-Medium mit einer Kolonie beimpft und in einem Schüttler über Nacht bei 37°C

200 rpm inkubiert. 200 ml LB-Medium wurden mit 1 ml Vorkultur beimpft und bis zu einer OD_{600} 0,4–0,6 bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Die Zellen wurden für ca. 10–15 min auf Eis abgekühlt und bei 4°C für 10 min bei 6000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml eiskaltem FSB-Puffer resuspendiert und 15–30 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde dann wieder mit den gleichen Parametern pelletiert und in 3 ml eiskaltem FSB resuspendiert. Der Suspension wurden 105 μ l DMSO zugesetzt. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurden weitere 105 μ l DMSO hinzugefügt. Die kompetenten Zellen wurden in 50 μ l Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und -80°C gelagert. Die Transformationseffizienz der kompetenten Zellen wurde bestimmt und lag je nach verwendetem *E.coli* Stamm zwischen 10^6 bis 10^8 cfu/ml.

DNA-Transfer in chemisch kompetente *E.coli* Bakterien Das Einbringen von Plasmid-DNA durch die Zellwand kompetenter Bakterien wird als Transformation bezeichnet. Durch Ausplattieren dieser transformierten Bakterien auf antibiotikahaltigen Agarplatten erfolgt eine Selektion der Bakterien, die das eingeführte Plasmid besitzen. Kompetente *E.coli* Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Zu 50 μ l kompetenten Zellen wurden maximal 5 μ l DNA-Suspension eines Ligationsansatzes oder 0,1–1 ng Plasmid-DNA im gleichen Volumen dazugegeben und für 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden im Wasserbad bei 42°C 45 s (XL1-Blue) bzw. 30 s (Top10) inkubiert und sofort für ca. 2 min auf Eis abgekühlt. Für die XL1-Blue Zellen wurde der Hitzeschock in normalen Mikroreaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg), für Top10 in den gelieferten Reaktionsgefäßen durchgeführt und die Zellsuspension anschließend mit 450 μ l SOC-Medium aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 60 min bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Die Zellen wurden vorsichtig bei 3000 rpm (Rt) pelletiert und in 100 μ l 37°C warmen SOC Medium auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausplattiert. Einzelne Klone wurden in Flüssigkultur vermehrt, die DNA isoliert und mittels Restriktionsverdau bzw. Sequenzierung bestätigt.

III.3 Proteinchemische Methoden

III.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) werden die Proteine nach Denaturierung und Ladungsausgleich (durch β -Mercaptoethanol und SDS) in einer aus Acrylamid- und Bisacrylamid-Untereinheiten bestehenden Matrix nach ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch aufgetrennt (Laemmli, 1970). Die obere Phase des Gels (Sammelgel) hat eine geringere Polyacrylamidkonzentration als das Trenngel und dient zur Konzentration der Proben. In einer Gießvorrichtung (PeqLab, Erlangen) wurde zwischen zwei Glasplatten (je 85 x 65 mm) mit einem Abstand von 0,75 mm zunächst das Trenngel und nach dessen Polymerisierung das Sammelgel gegossen.

SDS-PAGE:

	Trenngel			Sammelgel
	10 %	12,5 %	15 %	5 %
30% Acrylamid / Bisacrylamid (29:1)	3,3 ml	4,13 ml	5 ml	1,66 ml
1,5 M TrisHCl (pH 8,8)	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	-
0,5 M Tris HCl (pH 6,8)	-	-	-	1,25 ml
10% SDS	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %
10% APS	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %
TEMED	6 μ l	6 μ l	6 μ l	12 μ l
ad 10 ml aqua dest.				

Abhängig von der Größe der aufzutrennenden Proteine kamen 10–15 %ige Trenngel zum Einsatz. Mit Hilfe eines Kamms wurden im Sammelgel 10 Taschen mit einem Füllvolumen bis ca. 25 μ l zur Probenbeladung freigehalten. Die zu untersuchenden Proteingemische wurden in 1 x Gellaufpuffer 2 - 5 min durch Kochen denaturiert, sofort auf Eis abgekühlt und für 3 min bei 14000 rpm bei 4°C abzentrifugiert. Nach dem Beladen der Taschen wurde die Elektrophorese mit 25 mA pro Gel in vertikalen Laufapparaturen (PeqLab, Erlangen) mit 1 x SDS-Gellaufpuffer durchgeführt. Zur Größenbestimmung der Proteine wurden kommerzielle Proteinstandards auf dem Gel aufgetragen.

III.3.2 Immundetektion von Proteinen (Westernblot)

Blot der Proteine auf Nitrozellulose

Beim Westernblot werden die Proteine mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen. Das Proteingemisch wurde dabei über SDS-PAGE aufgetrennt (siehe III.3.1) und in einem elektrischen Feld aus der Gelmatrix auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dies erfolgte im Semi-Trockenblot-Verfahren in einer Semi-Trockenblotkammer (LKB, Wien) gemäß Herstellerangaben. Der Erfolg der Proteinübertragung wurde durch eine reversible Ponceau S-Färbung überprüft. Dazu wurde die Membran 1 bis 5 min in Ponceau S-Lösung gefärbt, digital eingescannt und anschließend mit destilliertem Wasser wieder entfärbt.

Immunnachweis

Zum Immunnachweis von Proteinen wurde die Membran mindestens eine Stunde mit TBS-T/Magermilch [5 % (w/v)] (EDEKA, Berlin) blockiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper an die Membran zu verhindern. Der zu verwendende primäre Antikörper wurde entsprechend den Angaben in TBS-T/BSA [3 % (w/v)] oder TBS-T/Magermilch [3–5 % (w/v)] verdünnt. Die geeignete Konzentration und Blockierung wurde hierbei für jeden Antikörper empirisch ermittelt. Die Membran wurde eine Stunde mit 170 μ l Antikörperlösung/cm² bei Rt inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (10 min) der Membran in TBS-T wurde der ebenfalls in TBS-T/BSA oder TBS-T/Magermilch verdünnte Sekundärantikörper entsprechend den Angaben (siehe II.3) zugegeben. Dieser erkennt

die konstante Region des primären Antikörpers und ist somit speziesspezifisch. An den Sekundärantikörper ist eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, welche im anschließenden Detektionsverfahren eine photochemische Reaktion katalysiert. Deren Lichtentwicklung schwärzt einen Röntgenfilm an den Positionen eines immunreaktiven Proteins auf der Membran. Nach gründlichem Entfernen des überschüssigen Sekundärantikörpers durch vier- bis sechsmaliges Waschen (je 5 min) mit TBS-T wurde die Membran mit Detektionslösung gemäß Herstellerangaben 3 min behandelt (SupersignalWestDuration, Pierce). Die Detektionslösung wurde am Rand der Membran abgetupft und die Membran in Haushaltsfolie für verschiedene Zeiten gegen Röntgenfilme exponiert. Die optimale Expositionszeit wurde für jeden Westernblot empirisch ermittelt.

Strippen der Westernblotmembran

Zur Untersuchung eines Westernblots mit unterschiedlichen Primärantikörpern wurde die Nitrozellulosemembran gestrippt. Dazu wurde die Membran 2 h bei 50°C in Strip-Puffer und anschließend einmal 10 min in TBS-T bei Rt gewaschen. Zur Kontrolle wurde die Membran analog zum Westernblot mit Detektionslösung behandelt und für eine Stunde gegen einen Röntgenfilm exponiert. Im Anschluss wurde die Detektionslösung einmal 10 min bei Rt mit TBS-T abgewaschen. Das Westernblot Protokoll zum Immunnachweis (III.3.2) konnte nun wiederholt werden. Je nach Qualität der Antikörper konnte eine Westernblot Membran so bis zu fünfmal wiederverwendet werden. Zwischenzeitlich wurde die Membran bei 4°C gelagert.

Dot-Blot

Der Dot-Blot diente zum Testen von Antikörpern. Hierbei wurden verschiedene Konzentrationen von Antigen sowie Kontrollen zur Spezifität in einem Volumen von 5 μl direkt auf einen ca. 7 mm Streifen Nitrozellulose pipettiert und im Immunnachweis (III.3.2) analysiert. Die Spezifität der Antikörper, die im Dot-Blot mit Antigen reagierten, wurde im Westernblot weiter untersucht (III.3.2).

III.3.3 Bestimmung von Proteinmengen mittels Bradford-Reagenz

Der Bradfordassay wurde eingesetzt, um Proteinmengen absolut bzw. quantitativ zu bestimmen.

Hierbei wird die Verlagerung der Adsorption der kationischen (ungebundenen) zur anionischen (gebundenen) Form des Farbstoffes Coomassie Brilliantblau G250 (CBBG) gemessen.

Die Bestimmung der Adsorption (OD_{595}) erfolgte nach ca. 10 min in Plastikkuvetten im Photometer. Zur Messung der Proteinmenge wurde mittels definierter Standards (1,43; 2,86; 4,29; 5,72; 7,15 und 14,30 μg) (BioRad, München) eine Messkurve erstellt, anhand derer die absolute Proteinmenge ermittelt wurde.

Reaktionsansatz:

1 -10 μl	Probe
200 μl	CBBG - Biorad
ad 1 ml	aqua dest.

III.4 Reporterassays

Reporterassays wurden eingesetzt, um die Promotoraktivität des IFN- β Promotors und ISRE zu untersuchen. Als Reportergen wurde Luciferase verwendet, da diese leicht in einer Biolumineszenzreaktion nachzuweisen ist. Als experimentelle Reporter kamen entsprechend die Plasmide p125-Luc sowie pISRE-Luc zum Einsatz. Der p125-Luc Reporter wurde uns von Takashi Fujita, Kyoto, Japan zur Verfügung gestellt (Yoneyama et al., 1998) und enthält das -125 bis +19 Segment des humanen IFN- β -Promotors. Der pISRE-Luc Vektor (Clontech) enthält ein Repeat einer ISRE-Consensus Sequenz, (GAAACTGAAACT)₅, die in einer Vielzahl verschiedener ISG gefunden wird (Dale et al., 1989; Geiss et al., 2003). Alle Reporterassays wurden in mindestens zwei unabhängigen Ansätzen reproduziert.

Als unabhängiger Kontrollreporter kam der Vektor pCMV- β Gal zum Einsatz. IFN-unabhängig wird hierbei Betagalaktosidase über einen CMV-Promotor produziert.

III.4.1 IFN- β -Reporterassay

Ca. 1×10^6 MDCK2 Zellen wurden mit 0,1 μ g des experimentellen Reporters p125-Luc, 0,25 μ g des Kontrollreporters pCMV- β Gal und zwischen 0,5 μ g und 8 μ g des jeweiligen Effektorplasmides unter Verwendung von Lipofectamin 2000 (Invitrogen) transfiziert. Die Transfektionseffizienz wurde in einer parallelen Transfektion von 4 μ g GFP-Reporter (pEGFP-N1) kontrolliert. 24 h bis 48 h nach Transfektion wurden die Zellen mit delNS1 bei *multiplicity of infection* (MOI)-1 infiziert. 8 h nach Stimulation wurden die Zellen auf Eis geerntet.

III.4.2 ISRE-Reporterassay

Ca. 1×10^6 293T bzw. Huh7 Zellen wurden mit 0,1 μ g des experimentellen Reporters pISRE-Luc, 0,25 μ g des Kontrollreporters pCMV- β Gal und zwischen 0,5 μ g und 8 μ g des jeweiligen Effektorplasmides unter Verwendung von Lipofectamin 2000 (Invitrogen) transfiziert. Die Transfektionseffizienz wurde analog zum IFN- β -Reporterassay kontrolliert und lag bei 293T-Zellen in der Regel zwischen 60 und 100 %, Huh7-Zellen wiesen hingegen nur eine Transfektionseffizienz von unter 50 % auf. Eine deutliche Verbesserung der Transfektionseffizienzen, speziell für Huh7-Zellen, wurde im Verlauf dieser experimentellen Arbeit, durch den Einsatz von FuGENE6 (Roche) erreicht. Durch Transfektion von 1 μ g GFP-Reporter konnten hierbei ca. 100 % der 293T-Zellen, sowie etwa 70 % der Huh7-Zellen transfiziert werden. Für Transfektionen mit FuGENE6, wurden ebenfalls ca. 1×10^6 Zellen mit 0,1 μ g des experimentellen Reporters pISRE-Luc, 0,1 μ g des Kontrollreporters pCMV- β Gal und 0,8 μ g des jeweiligen Effektorplasmides mit 3 μ l FuGENE6 transfiziert. Um eine Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten, wurden die Transfektionen von 293T-Zellen weiterhin mit Lipofectamin 2000 durchgeführt.

24–48 h nach Transfektion mit Lipofectamin 2000 bzw. 48–72 h nach Transfektion mit FuGENE6 wurden die Zellen mit humanem IFN stimuliert und nach einer entsprechenden Inkubationszeit auf Eis geerntet. Zur Zellyse wurden die Zellen in 100 μ l Lysispuffer (Promega) durch Tauen-Frieren aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden bei 13000 rpm/min für 5 min abzentrifugiert, der Überstand wurde direkt im Luciferase- bzw. Betagalakto-

sidaseassay untersucht und für weitere Untersuchungen, wie z.B. Westernblot, bei -20°C gelagert.

III.4.3 Luciferaseassay

Luciferaseexpression wurde in $20\ \mu\text{l}$ des Zelllysates in einer weißen Mikrotiterplatte (Greiner) im Luminometer LB96V (Berthold Technologies, Bad Wildbad) gemessen. Zur Durchführung der Biolumineszenzreaktion wurde das „Luciferase-Detections-Kit“ (Promega) verwendet. Hierbei katalysiert die Luciferase die Oxidierung des D-Luciferins in Gegenwart von molekularem Sauerstoff, ATP und Mg^{2+} zu Oxyluciferin, wobei Licht mit einer Wellenlänge von $556\ \text{nm}$ freigesetzt wird. Da die gemessene Lichtemission proportional zur Menge an Luciferase im Zelllysate ist, lässt sich somit die Expression des Luciferasereportergens quantifizieren.

III.4.4 Betagalaktosidaseassay

Das Enzym Betagalaktosidase ist in der Lage, nicht-physiologische Substrate zu hydrolysieren. Bei der hier verwendeten kolorimetrischen Nachweisttechnik wird o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranoside (ONPG) zu freiem o-Nitrophenol hydrolysiert, wobei Licht mit einer Wellenlänge von $420\ \text{nm}$ adsorbiert wird.

Reaktionsansatz:

10 -50 μl	Zelllysate
ad 150 μl	Lysispuffer - Promega, Mannheim
1 μl	β -Mercaptoethanol
65 μl	ONPG [10 mg/ml]
81 μl	Na-Phosphat pH 7,5 [0,1 M]
3 μl	MgCl_2 [100mM]
300 μl	

Bei einem Überschuss an Substrat erhöht sich die Adsorption proportional zum eingesetzten Enzym, was eine Quantifizierung der Betagalaktosidase ermöglicht. Der Reaktionsansatz wurde 10–30 min bei 37°C inkubiert und anschließend mit $500\ \mu\text{l}$ Na_2CO_3 gestoppt. Die optische Dichte der Lösung (OD_{420}) wurde im Spektrometer bzw. im ELISA-Reader (Tecan, Crailsheim) gemessen.

III.5 *Electromobility Shift Assay* (EMSA)

Electromobility Shift Assays werden dazu verwendet DNA-Protein Interaktionen zu untersuchen, wie z.B. die Bindung von Transkriptionsfaktoren an einen Promotor. Hier wurde die Bindung an ISRE untersucht. Dazu wurden ^{32}P -markierte dsDNA-Sonden mit Zelllysate inkubiert und durch Gelelektrophorese nativ aufgetrennt. Gebundene Proteine laufen im Gel langsamer als die ungebundene Sonde, so dass es zu einem „Mobilitäts- oder Gel-Shift“ kommt. Die Identifizierung der Proteine erfolgt durch eine Inkubation mit spezifi-

schen Antikörpern. Diese binden an den Komplex aus DNA und Sonde, so dass dieser im Gel weiter retardiert wird. Dieses wird als „Supershift“ bezeichnet.

III.5.1 Herstellen der Sonde

Die Sonde wird durch Hybridisierung zweier komplementärer Oligonukleotide hergestellt. An das 5'-Ende wurde je eine Base G, A, T und C, angehängt.

Nach der Hybridisierung wurden die beiden 5'-Überhänge zur endständigen Markierung mit den entsprechenden $\alpha^{32}\text{P}$ -Nukleotiden aufgefüllt.

Zur Hybridisierung wurden je 100 pmol Oligos hybridisiert, 5 min bei 95°C denaturiert und langsam abgekühlt. Anschließend wurden die hybridisierten Oligonukleotide 1:100 in Oligo-Puffer verdünnt (1 pmol/ μl).

Reaktionsmix:

1 μl	hybridisierte Oligos [1 pmol/ μl]
8 μl	dGTP $\alpha^{32}\text{P}$ -dGTP [250 μCi]
8 μl	dCTP $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP [250 μCi]
8 μl	dATP $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP [250 μCi]
8 μl	dTTP $\alpha^{32}\text{P}$ -dTTP [250 μCi]
5 μl	Klenow-Puffer
1 μl	Klenow
<hr/>	
ad 50 μl	aqua dest.

Der Reaktionsmix wurde 25 min bei Rt inkubiert, anschließend wurde 1 μl dNTP-Lösung [je 6,5 mM] dazugegeben. Die Markierungsreaktion wurde nach 5 min bei Rt mit 1 μl EDTA (0,5 M pH 6,4) gestoppt. Ungebundene Nukleotide wurden über eine Microspin-Sephadex Säule (G25) gemäß Herstellerangaben entfernt. Die markierten Sonden hatten in der Regel eine Aktivität von ca. 100.000 cpm/ml.

III.5.2 Herstellen der Lysate

Für EMSA-Lysate wurden Zytoplasma und Nukleus getrennt aufgearbeitet. 1 x 10⁶-Zellen einer 35 mm Schale wurden in PBS aufgenommen und 16 s bei 14.000 rpm bei 4°C abzentrifugiert. Alle Proben wurden ab diesem Schritt ausschließlich auf Eis in vorgekühlten Mikroreaktionsgefäßen und Pipettenspitzen bearbeitet. Die Puffer CEB und NEB wurden bei -20°C gelagert und nach einmaligen Auftauen verworfen.

Das Pellet wurde in 20 μl CEB 5–8 mal mit der Pipette resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde anschließend für 16 s bei 14.000 rpm bei 4°C pelletiert. Der Überstand enthält die zytoplasmatische und das Pellet die nukleäre Fraktion. Der Überstand wurde für 10 min bei 14.000 rpm bei 4°C klarzentrifugiert, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Das Pellet mit der nukleären Fraktion wurde in PBS gewaschen, erneut pelletiert und in 20 μl NEB 5–8 mal mit der Pipette resuspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde das Lysat analog zur zytoplasmatischen Fraktion klarzentrifugiert, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

III.5.3 *Shift*- und *Supershift*-Reaktion

Zur *Shift*-Reaktion wurden die Proben in folgendem Reaktionsmix bei 25 min Rt inkubiert:

Reaktionsmix:

1,3 μ l	DTT [100 mM]
2 μ l	poly dI:C [1 mg/ml] (Roche)
2,5 μ l	Shift Puffer
0,2 μ l	32 P-markierte Sonde
<hr/>	
ad 8,5 μ l	aqua dest.

8,5 μ l Reaktionsmix wurden mit 4,5 μ l Zellysat 25 min bei Rt inkubiert und in einer Gelelektrophorese analysiert.

Zur *Supershift*-Reaktion wurde dem Reaktionsmix nach 15 min Inkubation 1 μ l 1:10 in *Shift*-Puffer verdünnter Antikörper zugegeben und weitere 15 min inkubiert.

III.5.4 Native PAGE

Die EMSA-Proben wurden in einer nativen PAGE (18 x 18 x 0,1 cm) aufgetrennt (Elektrophoresepuffer: 0,25 x TBE).

Nach einem Vorlauf der Gele von etwa 8 h bei 60 V wurden die Protein-DNA Komplexe auf das Gel geladen und für etwa 3 h (bis zum Durchlauf des Bromphenol-Markers) bei 60 V (4°C) elektrophoretisch aufgetrennt.

Anschließend wurde das Gel auf Whatman-Papier gelegt, in

Folie eingeschlagen und in einem Gelrockner getrocknet. Die Gele konnten dann in einer Autoradiographiekassette gegen einen Röntgenfilm (Kodak, Stuttgart) exponiert werden.

Polyacrylamid Gel (5 %):

6 ml	40% Rotiphorese Acrylamid
2,5 ml	5 x TBE
1 ml	10 % APS
100 μ l	TEMED
<hr/>	
ad 50 ml	aqua dest.

III.6 Gewebekultur

Alle Kulturzellen wurden mit dem entsprechenden Medium bei 37°C und 5 % CO₂ (w/v) in feuchter Atmosphäre gehalten. Am Boden der Kulturschale anhaftende Zellen wurden im Abstand von drei bis vier Tagen durch Trypsinbehandlung abgelöst. Zellen, die nicht fest am Boden der Kulturschale haften, wurden mechanisch durch Abspülen mit der Pipette vom Boden der Kulturschale abgetrennt. Geeignete Verdünnungen der so erhaltenen Zellsuspensionen konnten danach in neuen Kulturschalen eingesät werden. Alle Zellen wurden regelmäßig auf Mykoplasmenverseuchung überprüft. 293, 293T und Huh7 Zellen wurden in DMEM (10 % FCS, Glu, PenSrep) gehalten und MDCK2 in MEM (10 % FCS, Glu, PenSrep). Für Transfektions- bzw. Infektionsexperimente wurden die Medien entsprechend angepasst (II.9.2).

Mykoplasmen-Test

Mykoplasmen sind kleine intrazellulär wachsende Bakterien, die Zellwachstum und Stoffwechsel stören können. Speziell ein Einfluss auf das IFN-System ist mehrfach beschrieben. Daher wurden die Kulturzellen in regelmäßigen Abständen und bei Verdacht mittels PCR auf Mykoplasmen getestet.

Mykoplasmen-PCR:		Thermocycler Einstellungen:		
5 μ l	aufgearbeiteter Kulturüberstand	Temp.	Zeit	Zyklen
2,5 μ l	10 x Puffer (Eppendorf, Hamburg)	94°C	2 min	
0,75 μ l	MgCl ₂ [50 mM] (1,5 mM)	94°C	15 s	} 25 \odot
0,5 μ l	dNTPs [10 mM]	55°C	30 s	
0,5 μ l	GPO-3 [25 μ M]	72°C	1 min	
0,5 μ l	MGSO [25 μ M]	72°C	7 min	
0,1 μ l	Taq-Polymerase [5 U/ μ l] (Invitex, Berlin)	4°C	∞	
ad 25 μ l aqua dest.				

Hierzu wurden 140 μ l aus einem 3-Tage-alten Zellkulturüberstand mit dem Viral-RNA-Kit (Qiagen, Hilden) gemäß Herstellerangaben aufgearbeitet. Die Nukleinsäuren wurden in 50 μ l Puffer aufgenommen.

Je nach Mykoplasmenstamm werden unterschiedliche Fragmente amplifiziert. Als Positivkontrolle wurde mykoplasmenkontaminierter Kulturüberstand parallel aufgearbeitet, als Negativkontrolle Kulturmedium. Zur internen Kontrolle wurde ein Aliquot des zu untersuchenden Kulturüberstands mit kontaminiertem Überstand versetzt und aufgearbeitet. Kontaminierte Zelllinien wurden entsorgt.

DNA-Transfektion in eukaryontische Zellen

Für diese Untersuchungen wurde Plasmid-DNA mittels Liposomen in die Zelle eingebracht (Lipofektion). Liposomen sind kationische Lipidkomplexe, die aufgrund positiv geladener Kopfgruppen mit den negativ geladenen Phosphatgruppen des *DNA-backbones* interagieren und DNA-Lipidkomplexe (Lipoplexe) bilden. Diese verschmelzen mit der Zellmembran, so dass DNA in die Zelle eingeschleust wird. Für die Lipofektion wurde das kommerzielle Transfektionsreagenz Lipofectamin 2000 (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

293, 293T, Huh7 oder 3T3 Zellen wurden in Suspension wie folgt transfiziert. Zur Vorbereitung wurden 1×10^7 Zellen durch Trypsinbehandlung vom Boden der Kulturflasche gelöst und in 10 ml des entsprechenden Transfektionsmediums aufgenommen. Des Weiteren wurden 2 ml des auf 37°C vorgewärmten Transfektionsmediums in 35 mm Kulturschalen vorgelegt.

Für jede Transfektion wurde Plasmid-DNA in einem Endvolumen von 200 μ l OptiMem-I (Invitrogen, Karlsruhe) aufgenommen. In einem zweiten Mikroreaktionsgefäß wurde Lipofectamin 2000 (1 μ l pro μ g Plasmid-DNA) in einem Endvolumen von 200 μ l OptiMem-I aufgenommen und 5 min inkubiert. Anschließend wurden die beiden Ansätze

vermischt und 20 min bei Rt inkubiert. In dieser Zeit wurden die Zellen durch Zentrifugation (1000 rpm, 3 min, Rt) pelletiert und anschließend in 2,5 ml vorgewärmtem Transfektionsmedium aufgenommen. Für jeden Transfektionsansatz wurden 250 μl dieser Zellsuspension in die vorbereiteten Kulturschalen gegeben. Nach Ablauf der 20-minütigen Inkubation wurde das Transfektionsgemisch der Zellsuspension hinzu gegeben. Die Zellen inkubierten anschließend insgesamt 24 oder 48 Stunden bei 37°C, wobei 8 h nach Transfektion das Transfektionsmedium durch frisches ersetzt wurde.

Basierend auf dem Protokoll von Basler et al., 2003 wurde das Verhältnis von DNA-Mix zu Lipofektions-Mix für eine MDCK2-Transfektion leicht modifiziert. Die DNA wurde in einem Endvolumen von 50 μl OptiMem-I aufgenommen, Lipofectamin in 250 μl .

Zur Kontrolle der Transfektion wurde der Vektor pEGFP-N1, welcher ein Derivat des grün-fluoreszierenden Proteins (GFP) trägt, in einem separaten Ansatz transfiziert. GFP ist ein auto-fluoreszierendes Protein, welches ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert wurde und im Fluoreszenzmikroskop blaues Licht absorbiert, wobei es grünes emittiert.

Herstellung stabiler Zelllinien

Zur Herstellung stabiler Zellen wurde ein Plasmid transfiziert, welches neben dem für die entsprechende Fragestellung relevanten Gen ein weiteres zur Selektion der transfizierten Zellen trägt (z.B. für Neomycin-Resistenz). Zur Vorbereitung wurde eine letale Dosis des Antibiotikums, sowie der Zeitrahmen für die Dauer der Selektion, empirisch ermittelt. Für MDCK2 Zellen entsprach dies 1 mg/ml G418 (Genetecin), für Huh7 und 293T Zellen ca. 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ über einen Zeitraum von ca. 14 Tagen.

Standardmäßig wurden 1×10^6 Zellen mit 10 μg der entsprechenden Plasmid-DNA in einer 35 mm Kulturschale transfiziert. 24–48 h nach Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin abgelöst. Zur klonalen Selektion wurden die Zellen 1/10 auf eine 94 mm Hybridomschale (Greiner) in 10 ml Zellkulturmedium plus der entsprechenden Menge Antibiotikum ausgesät. Anschließend wurden die Zellen bei regelmäßigem Wechsel des Selektionsmediums über einen Zeitraum von ca. 14 Tagen bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Nach dieser Selektion wurden nun Zellen aus einer 2 x 2 mm Nocke der Hybridomschale nach einem Waschschrift (PBS) mit 5 μl Trypsin abgelöst und entsprechend auf 96-well, 48-well und 24-well Zellkulturschalen in Selektionsmedium expandiert. Nach Bestätigung der Plasmidpräsenz mittels PCR wurden die Zellen ein bis zwei weiteren klonalen Selektionen unterzogen und wieder expandiert. Die fertigen Stocks wurden funktional bestätigt und aliquotiert in flüssigem Stickstoff gelagert.

Einfrieren von Zelllinien

Eukaryontische Zellen lassen sich einfrieren und dauerhaft in flüssigem Stickstoff lagern. Die dafür vorgesehenen Zellen wurden, ausgehend von einer konfluenten 75 cm^2 Kulturf Flasche, mit Trypsin abgelöst. Nach Zugabe des entsprechenden Kulturmediums wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert (2000 rpm, 3 min, Rt). Das Pellet wurde in 1 ml Medium mit 10 % DMSO resuspendiert und in zwei Polypropylen-Kryogefäße überführt. Daraus resultierte eine Zelldichte von 5×10^6 Zellen pro Kryogefäß. In einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox wurden die Zellen durch langsame, kontinuierliche Temperaturerniedrigung bis auf -70°C abgekühlt. Anschließend wurden die in den Kryogefäßen

gefrorenen Zellen zur Dauerlagerung in den Stickstofftank transferiert.

Zur Reaktivierung der Zellen wurden diese schnell bei 37°C aufgetaut und sofort in eine Zellkulturflasche mit entsprechend warmem Medium überführt. Nach 24 Stunden im begasten 37°C-Brutschrank wurden die Zellen weiter passagiert.

III.7 Virologische Methoden

III.7.1 Hämagglutinationstest

Der Hämagglutinationstest ist eine Methode, mit der die Menge an Viruspartikeln bestimmt werden kann. Sie beruht auf der Fähigkeit des Hämagglutinins, einem Oberflächenrezeptor des Influenza-Virus, Erythrozyten zu vernetzen (Hämagglutination). Unter Verwendung zunehmender Virusverdünnungen bei gleicher Erythrozytenkonzentration kann hierbei die Menge der Viruspartikel abgeschätzt werden (Barret und Inglis, 1985).

In eine 96-Loch Mikrotiterplatte mit V-förmigen Vertiefungen (Greiner) wurden in den ersten Vertiefungen einer Längsreihe 100 μl Virussuspension, in den anderen Vertiefungen der entsprechenden Reihen je 50 μl PBS vorgelegt. Ausgehend von der ersten Vertiefung wurde die Virussuspension durch Überführen von jeweils 50 μl in die folgende Schale jeweils um die Hälfte verdünnt. Aus der letzten Vertiefung wurden 50 μl verworfen. Anschließend wurden je 50 μl einer 1 % Hühnererythrozytenlösung (in PBS) hinzu pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von ca. 30 min auf Eis ließen sich die agglutinierten Proben an der Ausbildung eines gleichmäßigen Niederschlags (Agglutination) erkennen. Im Gegensatz dazu präzipitieren die Erythrozyten in Form eines Punktes in der Mitte des Bodens, wenn keine Hämagglutination stattgefunden hatte. Die Anzahl der 2er-Verdünnungen, die noch zu einer Hämagglutination geführt hatten, wird als HA-Titer angegeben.

III.7.2 Infektion von Kulturzellen mit dem Influenza A-Virus

Standardmäßig wurden ca. 10^6 MDCK2-Zellen in einer 35 mm Kulturschale infiziert. Dabei wurden die zu infizierenden Zellen mit PBS gewaschen und mit 250 μl Virussuspension überschichtet. Die Virussuspension wurde entsprechend der Fragestellung auf eine MOI zwischen 10^{-3} und 10 Viren pro Zelle eingestellt. Dazu wurden die Viren in PBS/BA/Mg²⁺/Ca²⁺ verdünnt. Die Zellen wurden bei Rt für 45 min inkubiert. Durch Schwenken der Schalen (etwa alle 15 min) wurde die Virussuspension gleichmäßig verteilt und ein Austrocknen der Zellen verhindert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit Infektionsmedium plus 1 $\mu\text{g/ml}$ TPCK-Trypsin (Sigma) zur Hämagglutininspaltung überschichtet. Die infizierten Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.

III.7.3 Virusanzucht von Influenza A im embryonierten Hühnerei

Die klassische Anzucht von Influenza-Viren erfolgt in embryonierten Hühnereiern (Barret und Inglis, 1985). Nach Infektion replizieren die Viren an der Allantoismembran und werden dann in die Allantoisflüssigkeit abgegeben. Die Allantoisflüssigkeit kann dann 48 h post Infektion (pi) abgeerntet werden.

Das Influenza A Wildtyp-Virus /A/PR8/34 wurde in 11 Tage alten embryonierten Hühnereiern (SPAFAS, Lohmann) angezüchtet. Die 11 Tage alten Eier wurden im Bereich der Luftblase

mit einer Jodlösung desinfiziert und ein Loch zum Ansetzen der Kanüle vorgebohrt. Ein Inokulum von 100 μl Virussuspension (in PBS/BA/Mg²⁺/Ca²⁺) wurde mit einer Kanüle (0,55 x 25 mm) senkrecht durch die perforierte Eierschale in die Allantoishöhle eingeführt. Das rekombinante Influenza A-Virus delNS1 wurde in 6 Tage alten Eiern angezüchtet. Die Eier wurden dazu mit einer Schierlampe durchleuchtet, um die Allantoishöhle seitlich am Ei zu markieren. Die markierte Stelle wurde mit Jodlösung desinfiziert und ein Loch vorgebohrt. Ein Inokulum von 100 μl Virussuspension wurde mit einer Kanüle (0,5 x 16 mm) rechtwinklig durch die perforierte Eierschale in die Allantoishöhle eingeführt. Die Öffnung der Eierschale wurde mit Ponal Klebstoff (Henkel) oder heißem Kerzenwachs verschlossen und für 48 Stunden bei 37°C und 60 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Eier über Nacht bei 4°C gelagert, um ein Einbluten aus den embryonalen Gefäßen zu verhindern. Die Entnahme erfolgte nach vorsichtiger Entfernung der oberen Eierschale aus der Allantoishöhle. Die Allantoissuspension wurde bei 3000 rpm 5 min bei 4°C abzentrifugiert und aliquotiert bei -80°C gelagert. Der Titer der Virusstocks wurde nach dem Einfrieren bei -80°C bestimmt, aufgetaute Proben wurden nicht wieder eingefroren.

III.7.4 Influenza A Titerbestimmung (Plaquetest)

Während der Hämagglutinationstest lediglich Aussagen zum Titer der zur Hämagglutination fähigen Partikel zulässt, wird im Plaquetest selektiv die Zahl der infektiösen Viruspartikel in PFU (*plaque forming units*) pro ml bestimmt (Barret und Inglis, 1985). Ein Zellkulturrasen wird hierbei infiziert und mit agarhaltigem Infektionsmedium überschichtet. Der Agar verhindert dabei die Diffusion freigesetzter Viren im Medium. Die Virusplaques lassen sich in dem Zellkulturrasen durch Kristallviolett gut sichtbar machen, da nur lebende Zellen gefärbt werden. Die durch die Virusinfektion abgestorbenen Zellen bleiben farblos und heben sich als Plaques deutlich von dem noch intakten Zellrasen ab.

Plaquemedium:

17,5 ml	2 x MEM (inkl. 2 mM L-Glutamin, 0,2 % BSA)
0,35 ml	DEAE Dextran (1 %)
0,35 ml	NaHCO ₃ (5 %)
35 μl	TPCK-behandeltes Trypsin (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
ad 28 ml	aqua dest.

MDCK2-Zellen wurden in 6-well Platten mit 6 seriellen 10er-Verdünnungen, üblicherweise von 10⁻³ bis 10⁻⁸ für 45 min infiziert (siehe III.7.2). Geschmolzener Oxoid-Agar (2 % (w/v) in aqua dest.) wurde auf 50°C bereitgestellt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die infizierten Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Das auf 42°C vorgewärmte Plaquemedium wurde mit 10 ml Oxoid-Agar versetzt und vom resultierenden Gemisch wurden jeweils 2 ml pro well auf die Zellen gegeben. Die infizierten Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert nachdem der Agar bei Rt erstarrt war. Nach 2 bis 4 Tagen waren die Plaques durch den Agar zu sehen und konnten entweder gestochen oder gefärbt werden. Beim Stechen werden „isogene“ Viren eines einzelnen Plaques geerntet und stehen für weitere Selektions- bzw. Reinigungsschritte zur Verfügung. Mit einer sterilen Pasteurpipette wurde der virushaltige Agar über einem Plaque ausgestochen und in ein Mikroreaktionsgefäß überführt, in dem 500 μl PBS/BA/Mg²⁺/Ca²⁺ vorgelegt worden waren. Die im Agar enthaltenen Viren wurden über Nacht bei 4°C eluiert. Zur Bestimmung des Plaquetiters wurden die Zellen mit Kristallviolett gefärbt. Dazu wurden zwei Milliliter einer Kristallviolettlösung auf den Agar gegeben. Am nächsten Tag wurde der Agar mit Hilfe eines Spatels entfernt und überschüssiger Farbstoff wieder mit aqua dest. herausgewaschen. Die Plaques der einzelnen Schalen wurde ausgezählt und zur Berechnung des Virustiters mit der jeweiligen Verdünnungsstufe multipliziert. Die daraus resultierende Anzahl der infektiösen Partikel (PFU)

pro ml Virussuspension diene z.B. zur Einstellung einer reproduzierbaren Viruskonzentration für Infektionsversuche, die als MOI angegeben wird.

III.7.5 HCV-Genotypbestimmung

Die Bestimmung des HCV-Genotyps erfolgte durch Reverse-Hybridisation (Inno LiPA HCV II, Innogenetics, Gent, Belgium) und wurde in der Arbeitsgruppe von PD. Dr. Berg an der Charité durchgeführt. Der Genotyp aller in dieser Arbeit verwendeten Patientenseren wurde mittels Sequenzierung des gesamten NS5A-ORFs bestätigt.

III.7.6 HCV-Titerbestimmung

Zur Titerbestimmung wurde RNA aus Serum von HCV-Patienten mit dem „Viral-RNA-Kit“ von Qiagen isoliert und mittels quantitativer *Real-Time*-PCR (siehe III.1.3) bestimmt. Das Umschreiben in cDNA und die PCR wurden mit Hilfe des Qiagen „One-Step RT-PCR-Kit“ durchgeführt.

Zur Standardisierung der quantitativen PCR werden die Virustiter nicht als gemessene Genomäquivalente angegeben, sondern als internationale Units (IU) gemäß den Herstellerangaben der entsprechenden PCRs. Für die ROTH-Primer und die HCV-Sonde gilt: 2,5 Genomäquivalente [eq] entsprechen 1 IU.

Real-Time-PCR Protokoll:

2,5 - 5 μ l	gereinigte RNA
5 μ l	5 x OneStep-Puffer ^a
2,5 μ l	MgCl ₂ [25 mM]
2,5 μ l	dNUTPs [10 mM]
0,5 μ l	Primer ROTH-1 [25 μ M]
0,5 μ l	Primer ROTH-2 [25 μ M]
0,5 μ l	HCV-Sonde [10 μ M]
0,5 μ l	RNAsin [40 U/ μ l]
1 μ l	OneStep-Enzym-Mix

ad 25 μ l aqua dest.

Thermocycler Einstellungen:

Temp.	Zeit	Zyklen
50°C	30 min	
95°C	15 min	
94°C	15 s	} 40 \odot
58°C	1 min	
4°C	∞	

^aFür die *Real-Time*-PCR wurde dem OneStep-Puffer der Farbstoff 10 % Rox beigefügt.