

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Zellen

	Zellen	Zelltyp	Herkunft
Suspensionszellen	L23	Porcine B-Lymphozyten	ECACC 91012318
	L35	Porcine T-Lymphozyten	ECACC 91012319
	L52	Porcine B-Lymphozyten	ECACC 91012321
Adhärente Zellen	PK15	Schweineniere	ATCC CCL-33
	PK15	Schweineniere	Italien, Universität von Ferrara
	POEK	Schweineniere	Robert Koch-Institut
	PS	Schweineniere	MWIIW
	WSH	Wildschweinhaut	Robert Koch-Institut
	293	Humane embryonale Niere	ECACC 85120602

Tab 3.1: verwendete Zellkulturzellen

3.1.2 Chemikalien

AG 501-X8(D)	Bio-Rad, Herkules/USA
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt/D
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Merck, Darmstadt/D
Agarose für Gelelektrophorese	Life Technologies, Paisleys/UK
Ampicillin	Sigma, St. Louis/USA
APS (Ammoniumpersulfat)	BRL, Gaithersburg/USA
Bacto-Agar	Difco, Detroid/USA
Bacto-Trypton	Difco, Detroid/USA
Bacto-Yeast-Extrakt	Difco, Detroid/USA
Bidestilliertes Wasser	Fluka, Buchs/CH
Blockreagenz	Roche Diagnostics, Mannheim/D
Bovines Serum Albumin (BSA)	New England Biolabs, Beverly/USA
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg/D
CDP-Star, Ready-to-use	Roche Diagnostics, Mannheim/D
Chloroform:Isoamylalkohol	Appligene, Gaithersburg/USA
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich, Steinheim/D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt/D; Sigma, St. Louis/USA
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma, St. Louis/USA
Dithiothreitol (DTT)	Life Technologies, Paisleys/UK
Ethanol	Merck, Darmstadt/D

Ethidiumbromid	Biomol, Hamburg/D
Ethylendiamintetraacetylsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt/D
Ficoll 400	Sigma, St. Louis/USA
Formamid	Merck, Darmstadt/D
Formaldehyd	Merck, Darmstadt/D
Glycerin	Merck, Darmstadt/D
Harnstoff	Amresco, Solon/USA
H ₂ O, RNase-, DNase-frei	Fluka, Buchs/CH
Hoechst H33258 (Farbstoff)	Molecular Probes, Eugene/USA
IPTG	Biomol, Hamburg/D
(Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid)	
Isopropanol	Merck, Darmstadt/D
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt/D
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Fluka, Buchs/CH
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma, St. Louis/USA
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck, Darmstadt/D
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt/D
β -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg/D; Merck, Darmstadt/D
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt/D
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt/D
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt/D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt/D
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)	Biomol, Hamburg/D
PolyacrylamidLösung 30% (29:1)	Roth, Karlsruhe/D
Propanol	Merck, Darmstadt/D
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt/D
Sucrose	Merck, Darmstadt/D
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Eastman Chemical Company, New Haven/USA
Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Sigma, St. Louis/USA
Tween 20	Merck-Schuchart, Hohenbrunn/D
X-Gal (5-Bromo-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid)	Biomol, Hamburg/D

3.1.3 Enzyme, Nukleinsäuren, Nukleotide und Marker

AmpliTaq Gold DNA-Polymerase	Applied Biosystems, Foster City/USA
DNaseI, RNase frei	Roche Diagnostics, Mannheim/D
<i>EcoRI</i> , <i>PstI</i> , <i>SacI</i> , <i>SacII</i>	New England Biolabs, Beverly/USA
Expand High Fidelity Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim/D
Oligo dT-Primer	Life Technologies, Paisleys/UK
$\Phi\chi 174$ DNA- <i>Hae</i> III	New England Biolabs, Beverly/USA
λ DNA- <i>Hind</i> III	New England Biolabs, Beverly/USA
100 bp Ladder	New England Biolabs, Beverly/USA
RNA Molekular Gewichtsmarker I	Roche Diagnostics, Mannheim/D
DIG markiert 0,3-6,9 knt	
Superscript TM II Reverse Transkriptase	Life Technologies, Paisleys/UK
TaKaRa EX Taq TM	TaKaRa Biomedicals, Shiga/J
T7 RNA Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim/D
T4 Ligase	New England Biolabs, Beverly/USA

3.1.4 Klonierungsvektoren und Bakterienstämme

pCR 2.1	Invitrogen, Carlsbad/USA
pDsRed1N1	Novagen, Madison/USA
pUC18	Novagen, Madison/USA
TOP10 One Shot [®] E. Coli	Invitrogen, Carlsbad/USA

3.1.5 Reagenziensets (Kits)

ABI PRISM [®] Big Dye TM Terminators v 3.0 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City/USA
BD Cytofix/Cytoperm TM Kit	BD Biosciences, San Diego/USA
DIG Easy Hyb Granules	Roche Diagnostics, Mannheim/D
DIG Wash and Block Buffer Set	Roche Diagnostics, Mannheim/D
DIG RNA labeling Kit (SP6/T7)	Boehringer, Mannheim/D
DNeasy Tissue Kit	Qiagen, Valencia/USA
Expand High Fidelity PCR System	Roche Diagnostics, Mannheim/D
FirstChoice TM RLM-RACE-Kit	Ambion [®] Inc., Austin/USA
Perfect Prep Gel Cleanup Kit	Eppendorf, Hamburg/D
PCR DIG Probe Synthesis Kit	Roche Diagnostics, Mannheim/D

Qiagen Plasmid Purification Maxi Kit	Qiagen, Valencia/USA
QIAprep 8 Miniprep Kit	Qiagen, Valencia/USA
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Valencia/USA
QuantiTect SYBR Green PCR	Qiagen, Valencia/USA
RNase-free DNase Set	Qiagen, Valencia/USA
RNAimage Kit	GenHunter Corp., Nashville/USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Valencia/USA
TaKaRa Ex Taq™ PCR Kit	TaKaRa Biomedicals, Shiga/J
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen, Carlsbad/USA

3.1.6 Filter, Membranen, Säulen

Chromatographie Papier 3MM	Whatman®, Ltd., Maidstone/UK
Sterilfilter (0,2 und 0,45 µm)	Schleicher& Schuell, Dassel/D
Vakuumfiltrationseinheit, 250 ml; 500 ml	Nalgen Nunc International, Rochester/USA
MicroSpin Säulen	Amersham Biosciences, Piscataway/USA
Nylonmembran Hybond H+	Roche Diagnostics, Mannheim/D
QIA Shredder spin Säulen	Qiagen, Valencia/USA

3.1.7 Kunststoffartikel

Cryogefäße	Nunc, Roskilde/DK
Einweg-Zellkulturgefäße	Nunc, Roskilde/DK
Küvetten	Sarstedt, Nürnberg/D
Micronics für Durchflusszytometrie	Integra Biosciences, Fernwald/D
PCR-Pipettenspitzen mit Aerosolschutz	Molecular BioProducts, San Diego/USA
PCR-Pipettenspitzen ohne Aerosolschutz	Süd Laborbedarf, Gauting/D
PCR-Platten, 96-well (TaqMan)	ABgene, Epsom/UK
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Eppendorf, Hamburg/D
	Applied Biosystems, Foster City/USA
Röhrchen für Durchflusszytometrie	Costar, Corning/USA
SARAN-Folie	Dow Chemical Company, Midland/USA
Schweißfolien (TaqMan)	ABgene, Epsom/UK
Spritzen und Kanülen (Stericam)	Braun, Melsungen/D
Reaktionsgefäße 0,5 ml	Sarstedt, Nürnberg/D
1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg/D
15 ml, 50 ml	Falcon, Palo Alto/USA

	Greiner, Nürtingen/D
Ultrazentrifugengefäße	Beckman, Palo Alto/USA
96-well Mikrotiterplatten	Greiner, Nürtingen/D
3.1.8 Geräte und Hilfsmittel	
ABI PRISM™ 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Foster City/USA
ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer	Applied Biosystems, Foster City/USA
AxioCam HRC	Zeiss Vision, München/D
Axiovert 2000	Zeiss Vision, München/D
Brutschränke für Zellkultur	Heraeus, Osterode/D
BioMax™ MR1-Film	Kodak, Integra, Fernwald/D
Durchflusszytometer	Becton Dickinson, Franklin Lakes/USA
Feinwaage	Sartorius, Göttingen/D
Fluorometer	Turner Designs, Sunnyvale/USA
Fotodokumentationsanlage	INTAS, Göttingen/D
Gefrierschränke -80°C	Heraeus, Osterode/D
	Forma Scientific, Marietta/USA
	Liebherr, Biberach an der Riß/D
	Bosch, Stuttgart/D
Gelelektrophoresekammern, horizontal	Biometra, Göttingen/D
vertikal	BRL, Gaithersburg/USA
GenAmp®5700 Detection System	Applied Biosystems, Foster City/USA
Glaswaren (Kolben, Pipetten, etc.)	Brand, Wertheim/D
Geltrockner	Bio-Rad, München/D
Hybridisierungsöfen	Biometra, Göttingen/D
Kühlschränke	Bosch, Stuttgart/D
	Liebherr, Biberach an der Riß/D
Lichtmikroskope	Zeiss, Jena/D
	Nikon, Tokio/J
Lumi-Film	Roche Diagnostics, Mannheim/D
Chemiluminescent Detection Film	
Magnetrührer	IKA Werk, Staufen im Breisgau/D
pH-Messgerät	Beckman, Palo Alto/USA
Pipetten	Gilson, Columbus/USA
	Eppendorf, Hamburg/D

Pipettboy	Tec No Mara AG, Zürich/CH
Röntgenfilmentwickler	AGFA, Mortsel/B
Röntgenfilmkassetten	Rothhaar & Schroeder, Heidelberg/D
Spannungsgeräte	Biometra, Göttingen/D GibcoBRL, Gaithersburg/USA
Spectrophotometer DU 640B	Beckman Coulter, Fullerton/USA
SpeedVac-Zentrifuge	Savant, Hicksville/USA
Thermocycler	Applied Biosystems, Foster City/USA Biometra, Göttingen/D MJ Research, Biozym, Oldendorf/D
Tischzentrifugen	Eppendorf, Hamburg/D
Transilluminator	Rothhaar & Schröder, Heidelberg/D
Ultrazentrifuge	Beckman, Palo Alto/USA
UV-Handlampe	Novodirekt, Karlsruhe/D
UV Stratalinker™	Stratagen, La Jolla/USA
Vakuumblokkammer VacuGenXL	Pharmacia, Uppsala/S
Vortex	Roth, Karlsruhe/D
Wasserbäder	GFL, Burgwedel/D Haake, Karlsruhe/D
Zählkammer	Brand, Wertheim/D
Zentrifugen	Heraeus, Osterode/D

3.1.9 Puffer, Lösungen

Bakterien- und Zellkulturmedien

Alle Pulvermedien wurden nach Herstelleranleitung zubereitet und steril filtriert.

Bakterienkultur

LB-Flüssigmedium	10 g/l Bacto- Trypton 5 g/l Bacto- Yeast- Extrakt 10 g/l NaCl, pH 7,5 mit NaOH
LB-Agar	17 g/l Bacto-Agar in LB- Flüssigmedium
SOC	Invitrogen, Carlsbad/USA

Zellkultur

D-MEM	Life Technologies, Paisley/USA
-------	--------------------------------

RPMI 1640	Life Technologies, Paisley/USA
Trypsin EDTA	0,25% Trypsin 3 mM EDTA in PBS, pH 7,2

Sonstige Medien und Puffer

Ficoll-Paque (Plus)	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala/S
L-Glutamin	Sigma, St. Louis/USA
Natrium-Pyruvat	Sigma, St. Louis/USA
β -Mercaptoethanol	Invitrogen, Carlsbad/USA
Penicillin-Streptomycin (100 x)	Sigma, St. Louis/USA
Ciprofloxacin	ICN Biomedicals, Ohio/USA
Trypanblaulösung	0,25% Trypanblau in PBS
PBS	140 mM NaCl 2 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 2 mM KH ₂ PO ₄
PBS/FKS	2% (v/v) FKS in PBS 5% (v/v) FKS in PBS
PBS/EDTA	2% (v/v) FKS in PBS 2 mM EDTA in PBS

Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Easytides® ³³ P-ATP	NEN Life Sciences, Boston/USA
MgCl ₂	Applied Biosystems, Foster City/USA
dNTP	Applied Biosystems, Foster City/USA Roche Diagnostics, Mannheim/D TaKaRa Biomedicals, Shiga/J
PCR-Puffer	Applied Biosystems, Foster City/USA Roche Diagnostics, Mannheim/D TaKaRa Biomedicals, Shiga/J
TaqMan® Universal Master Mix	Applied Biosystems, Foster City/USA
QuantiTect SYBR Green PCR	Qiagen, Valencia/USA

Gelelektrophorese

Ethidiumbromidlösung	10 g/l Ethidiumbromid in H ₂ O
----------------------	---

Laufpuffer, Standardgel	2 x	TBE
	0,4 µg/ml	Ethidiumbromid
Laufpuffer, Northern Blot	1 x	MOPS
Probenpuffer, Standardgel	7 Teile	70% Sucrose
	5 Teile	Bromphenolblau-Lsg., gesättigt in H ₂ O
Probenpuffer, Northern Blot		deionisiertes Formamid: 250 µl
		37% Formaldehyd: 83 µl
		10 x MOPS: 50 µl
		100% Glycerol: 50 µl
		2,5% Bromphenolblau: 10 µl
TBE-Puffer (10 x)		Life Technologies, Paisley/USA
10 x MOPS	200 mM	MOPS
	50 mM	NaAcetat
	20 mM	EDTA, pH7

Blotlösungen

Blockreagenz	1 x	10 x Blocklösung 1:10 in 1 x Maleinsäurepuffer Roche Diagnostics, Mannheim/D
Hybridisierungslösung		DIG Easy Hyb Granules gelöst in DEPC Roche Diagnostics, Mannheim/D
Transferpuffer	20 x	SSC
Hochstringenzpuffer	0,1 x	SSC, mit 0,1% SDS
Niedrigstringenzpuffer	2 x	SSC, mit 0,1% SDS
Waschpuffer	0,1 M	Maleinsäure
	0,15 M	NaCl, pH 7,5
	0,3% (v/v)	Tween 20
Maleinsäurepuffer	0,1 M	Maleinsäure
	0,15 M	NaCl, mit NaOH auf pH 7,5
Detektionspuffer	0,1 M	Tris-HCl
	0,1 M	NaCl, pH 9,5 (20°C)
20 x SSC:	3 M	NaCl
	0,3 M	NaCitrat, pH 7

Puffer und Lösungen

DEPC-Wasser	1%	DEPC in Bidest über Nacht gerührt, autoklaviert
First Strand Buffer, 5 x		Life Technologies, Paisley/ USA

Formamid, deionisiert		Deionisierung mit Ionenaustauscher AG 501-X8(D)
Messlösung Fluorometer	0,1 µg/ml	H33258 in 1 x TNE-Puffer, pH 7,4
Natriumacetat-Lösung, 3 M	246,09 g/l	Natriumacetat, pH 7,4
TE-Puffer	10 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	1 mM	EDTA
X-Gal-Lösung	40 mg/ml	X-Gal in Dimethylformamid

3.1.10 Seren und Antikörper

FKS (Fötales Kälber Serum)	Life Technologies, Paisley/USA
Pferdenormalserum	Vectorlabs, Burlingame/USA

Primärantikörper

Anti-Digoxigenin, AP-konjugiert	Roche, Diagnostics, Mannheim/D
MHC I: 74-11-10	Saalmüller, BFAV, Tübingen/D
(SLA class I polymorphic IgG _{2β})	DPC, Bierman, Bad Nauheim/D

Sekundärantikörper

Ziege-anti-Maus-IgG-FITC (Fc _γ -Fragment)	Jackson ImmunoResearch, Inc., Baltimore/USA
Ziege-anti-Maus-IgG-PE (F(ab) ₂ -Fragment)	Rockland, Gilbertsville/USA

3.1.11 Software

Autoassembler 2.1	Applied Biosystems, Foster City/USA
ABI PRISM DNA Sequencing Analysis 3.7	Applied Biosystems, Foster City/USA
AxioVision 3.1.2.1	Carl Zeiss Vision, München/D
CellQuest 3.3	Becon Dickinson, Franklin Lanes/USA
EndNote 5	ISI ResearchSoft, Berkeley/USA
Factura 2.2	Applied Biosystems, Foster City/USA
FileMaker Pro 4.0 und 5.0	FileMaker Inc., Santa Clara/USA
Freehand 8.0.1	Makromedia Inc., San Francisco/USA
MacVector 7.0	Symantec Corp., Cupertino/USA
Netscape Navigator 4.5	Netscape Communications Corp., Mountain View/USA
Photoshop 5.0	Adobe Systems Inc., San Jose/USA
Primer Premier 5.0	Premier Biosoft International, Palo Alto/USA

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Die Kultivierung permanenter Zellkulturzellen erfolgte in Einweg-Plastikkulturgefäßen verschiedener Größe und Ausführung in einem Brutschrank bei 37°C und einer 5% CO₂ enthaltenden, feuchten Atmosphäre. Zugeseztes FKS wurde zuvor eine Stunde bei 56°C inaktiviert.

Adhärente Zellen

Die Haltung von PS-, PK15-, POEK-, WSH- und 293-Zellen erfolgte in D-MEM Medium mit einem Anteil von 5% FKS. Ein geschlossener Zellrasen erforderte ein Umsetzen der Zellen mittels Trypsinbehandlung. Dazu wurde das verbrauchte Medium abgenommen, die Zellen mit Trypsin benetzt und für 5-10 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Abgelöste Zellen wurden in 5-10 ml Medium aufgenommen und die Zellkonglomerate in wiederholten Pipettiervorgängen vereinzelt. Ein Aliquot dieser suspendierten Zellen wurde mit frischem Medium weiter kultiviert oder für Versuche eingesetzt. Das Verdünnungsverhältnis betrug zwischen 1:3 und 1:20.

Suspensionszellen

Diese Zellen wuchsen in RPMI 1640-Medium, supplementiert mit 10% FKS, 2 mM L-Glutamin, 1mM Natrium-Pyruvat und 0,05 mM β -Mercaptoethanol. Verwendung fanden die porcinen B-Zellen L23, L52 und T-Zellen L35 in einer Dichte von 1×10^6 Zellen pro ml Medium. Ein Ausdünnen erfolgte nach Aufschütteln durch Abnahme der Zellen und Zugabe frischen Mediums.

Zellzählung

Hierzu erfolgte eine Lebend/Totfärbung mit Trypanblau und die Auszählung in der Neubauer-Zählkammer. 10 μ l der Zellsuspension wurden mit 190 μ l Trypanblaulösung vermennt und 5 Minuten inkubiert. Lebendige Zellen erschienen weiß. Tote Zellen werden durch das Eindringen von Trypanblau leuchtend blau angefärbt. Alle vier großen Eckquadrate wurden ausgezählt, das Ergebnis durch vier geteilt und mit dem Verdünnungskoeffizienten des Kammer- und Zellvolumens multipliziert:

$$\text{Zellzahl/ ml} = n \times 20 (\text{Verdünnungsfaktor}) \times 10^4 (\text{Kammergröße})$$

3.2.2 Transfektion

Um DNA in eukaryote Zellen einzuschleusen (Transfektion) und hierbei die Doppellipidmembran der Zelle zu durchdringen, muss die DNA in sog. Mizellen verpackt werden. Positiv geladene Enhancermoleküle (Verstärker) kondensieren die negativ geladene DNA, um sie dann mittels nicht-liposomaler kationischer Lipide zu komplexieren und in eine Mizellenform für den Transfer in die Zielzelle zu überführen. 24 Stunden vor Transfektion wurden frische Zellen ausplattiert. Sie sollten eine Konfluenz von etwa 60% zum Transfektionszeitpunkt aufweisen. Die zu transfizierende DNA wurde je nach Kulturplatte in Puffer EC aufgenommen (Tab. 3.2), danach Enhancerlösung zugesetzt und dieses nach Mischen bis zu 5 Minuten inkubiert. Es erfolgte die Zugabe des Transfektionsreagens Effectene™. Gleichmäßige Mizellenbildung erforderte ein länger dauerndes Durchmischen und eine Inkubation bei Raumtemperatur für bis zu 10 Minuten. Während dieser Zeit wurden die Zellen durch Waschen mit PBS Puffer und Zugabe frischen Mediums vorbereitet. Gebildete DNA-Mizellen wurden in Medium suspendiert und tröpfchenweise über den Zellrasen pipettiert. Um eine gleichmäßige Verteilung der Komplexe zu erreichen, war ein vorsichtiges Schwenken der Kulturzellen erforderlich. Das Einschleusen der DNA in die Zellen erfolgte während der nachfolgenden Inkubation im Brutschrank bei 37°C. 24 Stunden später wurden nicht aufgenommene Komplexe durch Mediumwechsel entfernt.

Behältnis	DNA (µg)	EC-Puffer (µl)	Enhancer (µl)	Effectene™ (µl)	Medium zu Komplex (µl)	Medium zu Zellen (µl)
6 Loch	0,4	ad 100	3,2	10	600	1600
12 Loch	0,3	ad 75	2,4	6	400	800
24 Loch	0,2	ad 60	1,6	5	350	350

Tab. 3.2: Mengen an zuzusetzenden Puffern für Transfektionen in unterschiedlichen Zellkulturbehältnissen mit Effectene™ Transfection Reagent Kit (Qiagen).

3.2.3 Infektion

Zur Infektion adhärenter Zellen und Suspensionszellen mit PCV1 oder PCV2 wurde Zellüberstand aus PS-Zellen eingesetzt, der infektiöse Viruspartikel mit einem bekannten Titer enthielt. Für einen aus PK15-Zellen geernteten Überstand erfolgte eine Kopiezahlbestimmung mittels TaqMan® PCR, hierbei wurden für PCV1 1×10^6 und für PCV2 2×10^7 Kopien gezählt. Verschiedene Volumina dieses Überstandes wurden 24 Stunden nach Aussaat der Zellen zugesetzt und je nach Versuch unterschiedlich lange auf den Zellen belassen.

3.2.4 RNA

Extraktion aus eukaryoten Zellkulturzellen und Konzentrationsmessung

Die RNA-Ernte aus Zellkulturzellen erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen. Ein DNaseI Verdau zur Entfernung von DNA-Kontaminationen war direkt auf der Silikamembran möglich. Zur Gewinnung von RNA aus adhärennten Zellen konnten die Zellen unmittelbar nach einem Waschschrift mit PBS auf der Zellkulturoberfläche mit dem Lysispuffer RLT aufgeschlossen werden. Bei Suspensionszellen war eine vorhergehende Zentrifugation für 10 Minuten bei 300 g in einer Tischzentrifuge (Eppendorf 5415C) nötig. Bei der Lyse kam es durch Zugabe von chaotropen Salzen zu einem Aufbrechen der Zellen und Nuclei sowie der Inaktivierung von RNasen. Das Lysat wurde nach Herstellerangaben mit QIAshredder® Säulen homogenisiert. Nach Zugabe von Ethanol (70%) zu dem Homogenisat im doppelten Volumen konnte die RNA nach Beschickung der Säule an der Silikaoberfläche der Membran der RNeasy Mini Column anheften. Zentrifugations- und Waschschriffe mit Puffer RW1 entfernten Proteine, Inhibitoren und chaotrope Salze. Ein DNaseI Verdau mittels Qiagen RNase-free DNaseI Set schloss sich direkt auf der Säule an. Der RNA wurde in Puffer RDD suspendierte DNaseI zugesetzt und diese bei Raumtemperatur bis zu 45 Minuten inkubiert. Additiv fand eine geringe Menge DNaseI eines anderen Herstellers (Roche, Mannheim) Verwendung. Weitere Waschschriffe mit den Puffern RW1 und RPE schlossen sich an, bevor die RNA in RNase freiem Wasser eluiert werden konnte.

Die Messung der RNA fand am Spektrometer statt. Die RNA-Proben wurden in einer fünfzigfachen Verdünnung in Bidest gemessen. Der Quotient der Absorptionswerte der Wellenlängen 260 nm und 280 nm gab einen Hinweis auf Reinheit der RNA und DNA. Reine DNA bzw. RNA besitzt A_{260}/A_{280} -Raten von 1,7-2,0 bzw. 1,9-2,1.

Herstellung von Kontrollen für den Northern Blot

Zur Kontrolle erfolgreicher Sondenhybridisierung im Northern Blot war es erforderlich, RNA des gesuchten Transkriptes als Positivkontrolle einzusetzen. Zur Herstellung dieser RNA wurde 1 µg des Fragment enthaltenden Vektors verwendet und das Plasmid mittels *SacI* Restriktionsverdau an der multiplen Klonierungsstelle (MCS) geschnitten und damit linearisiert. Nach zwanzigminütiger Hitzeinaktivierung des Restriktionsenzym bei 65°C konnte eine DNA-abhängige RNA-Polymerase (T7-Polymerase) zur Synthese der RNA verwendet werden. Das Plasmid pCR2.1 trägt einen T7-Polymerase Promotor in unmittelbarer Nähe der MCS, das der Linearisierungsschnittstelle gegenüber liegt. Hierbei wurde das DIG RNA Kit (SP6/T7; Boehringer, Mannheim) ohne Zusatz des DIG-Markierungsmixes

gebraucht. Die Reaktionen wurden beide bei 37°C ausgeführt. Der Restriktionsverdau wurde über Nacht inkubiert, die RNA Synthese nach 2 Stunden beendet.

Linearisierung des Vektors pCR 2.1:

- DNA ad 1 µg
- NEB1 4 µl
- BSA 4 µl
- *SacI* 1 µl
- Bidest ad 40 µl

37°C über Nacht, danach 65°C 20 Minuten Inaktivierung

T7 RNA Synthese:

- DNA linearisiert in 20 µl
- 10 x Puffer 2 µl
- dATP/dCTP/dGTP/dUTP je 1 µl
- DTT 1 µl
- RNase Inhibitor 1 µl
- T7-Polymerase 2 µl
- Bidest ad 50 µl 2 Stunden, 37°C Wasserbad

3.2.5 cDNA Synthese

RNA wird schnell durch ubiquitär vorkommende RNasen degradiert. Von der DNA-synthetisierenden TaqPolymerase wird RNA nur unzureichend als Matrize in der PCR erkannt. Aus diesen Gründen war es erforderlich, die RNA in stabilere, komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben. Hierzu wurde reverse Transkriptase eingesetzt, die als RNA-abhängige DNA-Polymerase einen DNA-Komplementärstrang zur vorhandenen RNA hinzufügt. Der Synthesestartpunkt wird durch ein an die RNA bindendes Oligonukleotid gegeben. mRNA ist durch eine CAP-Struktur am 5'-Ende und einen langen posttranskriptional modifizierten Polyadenylbereich am 3'-Ende charakterisiert. Durch Anlagerung eines komplementären Oligo-dT Fragmentes kann die cDNA Synthese vom 3'-Ende in Richtung 5'-Ende erfolgen. Hierbei kamen Reagenzien der Firma Invitrogen® zum Einsatz, die nach Herstellerangaben gehandhabt wurden.

Als Ausgangskonzentration dienten Mengen zwischen 0,5-2 µg Gesamt-RNA. Eine zehnmünütige Inkubation mit Oligo-dT Primern, dNTPs und Bidest in einem Volumen von 12 µl bei 65°C wurde zur Aufhebung von Sekundärstrukturen durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde danach sofort auf Eis abgekühlt und mit 4 µl First Strand Buffer, 2 µl DTT und 1 µl Bidest versetzt. Nach einer 2minütigen Erwärmung auf 42°C wurde die RNA

durch Zugabe von 1 µl M-MLV (Moloney Mouse Leukemia Virus) oder SuperscriptTMII reverser Transkriptase bei 42°C während einer fünfzigminütigen Inkubation in cDNA umgeschrieben. Erhitzen auf 72°C für 15 Minuten denaturierte das Enzym des Reaktionsansatzes, bevor die cDNA zur Lagerung bei -20°C eingefroren werden konnte. Zur Kontrolle unerwünschter DNA-Kontamination in der Ausgangs-RNA wurden Proben der gleichen Behandlung unterzogen, der RNA anstelle der reversen Transkriptase allerdings lediglich Puffer bzw. Bdest zugegeben. War eine DNA-Kontamination in der eingesetzten RNA enthalten, so ergaben sich Produkte nach PCR-Amplifizierung dieser Kontrollreaktionen.

3.2.6 Differential Display

Das Differential Display wurde als Ausgangsmethode gewählt, um differentielle Genexpression untersuchen zu können. Zellen wurden je nach Aufgabenstellung mit virushaltigem Überstand oder Kontroll-Überstand behandelt bzw. mit religierter Virus-DNA oder einem Vektor transfiziert und nach verschiedenen Inkubationszeiten geerntet. Nach Spülung mit PBS wurde die RNA aus den Zellen mittels Qiagen RNeasy Mini Säulen extrahiert. Dreifachansätze pro infizierter bzw. nicht-infizierter Probe sollten falschpositive bzw. falschnegative Ergebnisse reduzieren.

Die RNA wurde mit sogenannten „Anchored Primern“ (H-T₁₁V) mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Diese Anchored Primer besaßen einen polydT-Anteil und waren in drei Fraktionen unterteilt, je nachdem welches Nukleotid (C, G oder A) dem polydT-Anhang als Erstes folgte. Es wurden 0,1 µg Gesamt-RNA jeweils eingesetzt, die in einem 20 µl Reaktionsansatz umgeschrieben wurden.

DD reverse Transkription und DD RT-PCR

Für die reverse Transkription eines 20 µl Ansatzes wurde folgender Mix verwendet:

- dH₂O 9,4 µl
- 5 x RT Puffer 4,0 µl
- dNTP (250 µM) 1,6 µl
- Gesamt-RNA (DNA frei) 2,0 µl (0,1 µg/µL, frisch eluiert)
- H-T₁₁V (2 µM) 2,0 µl

Thermocyclerprogramm:

- 5 min bei 65°C zur Auflösung von Sekundärstrukturen der RNA
- 60 min bei 37°C zur Primerbindung und cDNA Synthese
- 5 min bei 75°C zur Denaturierung des Enzyms

Die Zugabe von 1 μl M-MLV (Moloney Mouse Leukemia Virus) reverse Transkriptase zu dem Gemisch erfolgte nach 10 min bei 37°C.

PCR-Ansätze sollten nachfolgend die entstehenden PCR-Produkte mit einem Radionuklid versehen. Hierbei wurden die durch den polydT-Anteil erkannten mRNAs während der DNA-Synthese mit ^{33}P -ATP markiert. Als Primerpaar dienten Kombinationen der zuvor verwendeten „Anchored polydT-Primer“ (H-T11V) der reversen Transkriptionsreaktion mit einem von 8 verschiedenen „Randomprimern“ (H-AP). Deren Sequenzen wurden laut Hersteller des Kits (RNAimage Kit, GenHunter) homolog zu hoch konservierten Bereichen bekannter Gene entworfen. In der PCR fanden die spezifischen Puffer und Primer des Herstellers Anwendung. In einem 10 μl Ansatz wurden die entstehenden Amplifikate der eingesetzten cDNA eines Volumens von 1 μl durch Einsatz von ^{33}P -ATP bei 40 oder 42°C markiert.

10 μl DD PCR-Ansatz:

• dH ₂ O	5 μl
• 10 x PCR Puffer	1 μl
• dNTP (25 μM)	0,8 μl
• H-AP Primer (2 μM)	1 μl
• H-T ₁₁ V (2 μM)	1 μl
• cDNA aus RT-Mix	1 μl
(mit demselben H-T ₁₁ V Primer)	
• α -(^{33}P)ATP (2000 Ci/mmol)	0,1 μl
• TaqDNA Polymerase	0,1 μl

Thermocyclerbedingungen:

<u>94°C</u>	<u>0:30</u>	} 40x
94°C	0:15	
42°C/40°C	2:00	
<u>72°C</u>	<u>0:30</u>	
72°C	5:00	

Diese Reaktionen fanden zur Gewährung gleicher Bedingungen ausschließlich im Thermocycler Peltier Thermal Cycler PTC-200 (MJ Research, Biozym, Oldendorf/D) statt.

Während des PCR-Laufs wurde ein 6% denaturierendes Polyacrylamidgel in TBE Puffer hergestellt und für mindestens 2 Stunden zur Polymerisierung horizontal gelagert.

DD Gel, Gelbeladung und Reamplifikation der Banden

Gelansatz:

- Polyacrylamid 9 ml
- 10 x TBE Puffer 6 ml
- H₂O 23,5 ml
- Harnstoff 30 g -> auf 50°C erwärmen, dabei rühren,

in einer Filtereinheit entlüften und in ein Becherglas überführen.

Polymerisierungsstarter hinzufügen:

- APS 180 µl
- TEMED 24 µl

Das so hergestellte Gel wurde mit Hilfe einer 50 ml Spritze in eine Sequenzgelkammer ohne Blasen eingegossen. Diese Kammer bestand aus zwei 40 x 50 cm großen Glasplatten, die mit 42 cm langen, 1,2 cm breiten und 0,5 mm dicken Platzhaltern am Rand und einem 28 cm langen Kamm am oberen Rand der Platten zur Bildung der Sammelkammern zusammengebaut wurde. Der Abstand der Kammspitzen betrug 0,5 cm. Zur Fixierung dienten Klammern, die ein Verrutschen beider Glasplatten gegeneinander verhinderten.

Das Gel konnte nach horizontaler Polymerisierung vertikal in die Elektrophoreseapparatur (Model S2, BRL) eingespannt und die Sammelkammern mit Laufpuffer befüllt werden. Diese standen am oberen und unteren Ende mit dem Gel in Kontakt. Das Gel lief bei 60 Watt für ca. 45 Minuten ohne Probenbeladung, bis eine Temperatur von ca. 40°C erreicht und es mit Puffer äquilibriert war. Der aus dem Gel freigesetzte Harnstoff behinderte ein Einfüllen der Proben und wurde durch Spülen der Taschen mit Laufpuffer entfernt. Je 2 µl der radioaktiven Probe wurden mit 3,5 µl Ladepuffer vermengt und 2 Minuten bei 85°C im Thermocycler denaturiert, bevor das Gel mit dem PCR-Reaktionsmix beladen wurde.

Nach Anschluss an eine Stromquelle (Electrophoresis power supply PS3003, GibcoBRL, Gaithersburg/USA) wurde das Gel konstant bei 60 Watt gehalten. Nach ungefähr 3,5 Stunden erreichte die Xylen-Bande des Ladepuffers das Ende des Gels und signalisierte das Ende des Laufs. Nach dem Abkühlen der Platten konnten diese gelöst und das auf einer der Glasplatten befindliche Gel auf Whatman® Papier (Whatman® Ltd., Maidstone, England) geblottet werden. In einem Flachbrett-Trockner (Model 538 Gel Dryer, Bio-Rad, München) erfolgte das Trocknen unter Vakuum 2 Stunden bei 80°C. Das auf Whatman® Papier übertragene und erkaltete Gel wurde zur Visualisierung im Dunkeln mit Klebestreifen als Markierung zur späteren Positionsbestimmung auf einem Röntgenfilm (Kodak, Integra, Fernwald) fixiert, die Gelseite war dem Röntgenfilm zugewandt. Die Expositionszeit des Gels auf dem Film variierte zwischen 12 und 48 Stunden. Nach Entwicklung (Entwickler Curix 60, AGFA,

Köln) konnte der Film im Gegenlicht ausgewertet werden. Die durch Nadelstiche markierten, ausgewählten Banden des Röntgenfilms wurden aus dem Gel ausgeschnitten und diese in 50 μl H_2O in einem Thermocycler für 10 min bei 4°C und 15 min bei 95°C gehalten. Nach der Elution aus dem Gel erfolgte eine Reamplifikation der Banden mittels PCR. 4 μl des erhaltenen Eluats wurden für einen 40 μl PCR-Ansatz überführt:

Reamplifikations-PCR:

- | | |
|--|--------------------|
| • dH ₂ O | 20,4 μl |
| • 10 x PCR Puffer | 4 μl |
| • dNTP (250 μM) | 3,2 μl |
| • H-AP Primer (2 μM) | 4 μl |
| • H-T ₁₁ V (2 μM) | 4 μl |
| • Eluat | 4 μl |
| • TaqDNA Polymerase | 0,4 μl |

Für die PCR wurden die gleichen Primer und Cyclerbedingungen wie in der Ausgangs-DD-PCR gewählt und ein Aliquot der Reaktion in der Agarosegelelektrophorese mit Ethidiumbromid nachfolgend visualisiert. Das erhaltene Fragment wurde frisch mittels TOPO TA Cloning® Kit in den Vektor pCR2.1 kloniert und in TOP10® Zellen vermehrt. Es folgte eine Plasmidpräparation, Konzentrationsmessung, Kontrolle der Insertgröße mittels *EcoRI* Verdau und Sequenzierung.

3.2.7 Northern Blot

Methoden

Der Northern Blot ermöglichte eine Darstellung der Transkripte, die im Differential Display eine Konzentrationsänderung zeigten. Hierbei werden die zugehörigen zellulären Transkripte sichtbar gemacht und ihre Größe sowie Konzentration bestimmt. Der Vergleich der Banden infizierter und nicht-infizierter Proben sollte die Aussage des Differential Displays überprüfen. In der Northern Blot Analyse wird Gesamt-RNA mittels Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt, durch Vakuumblot auf eine geladene Membran überführt und dort mittels UV-Crosslinking fixiert. Als Sonde wurde das im Differential Display amplifizierte und klonierte DNA-Fragment in der PCR mit digoxigeninmarkierten Nukleotiden versehen. Diese Sonde wird in einer Hybridisierungsreaktion über die mit RNA beladene Membran geführt und bindet an die Zielsequenz. Befindet sich das komplementäre RNA-Transkript in ausreichender Menge auf der Membran, so kann diese spezifische Bindung mit einem Farbstoff-gekoppelten Antikörper gegen die DIG-markierten Nukleotide auf einem sensitiven Röntgenfilm sichtbar gemacht werden.

Die RNA-Konzentration eines zellulären Gens, dessen Regulation eine Virusinfektion nicht beeinflusst, sollte in infizierten und nicht-infizierten Proben gleich sein. Zur Standardisierung muss deshalb die Transkriptintensität des gesuchten Gens mit der RNA Menge eines zellulären Standardgens verglichen werden. Hierfür wurde nach Bindung und Visualisierung der zu untersuchenden Gene die gebundene Sonde wieder abgewaschen und die Membran in einem zweiten Schritt mit einer β -Aktinsonde hybridisiert. Die Darstellung der Banden erfolgte auf Röntgenfilm. Als Positivkontrolle wurde RNA des im Vektor befindlichen DD-Fragmentes verwendet, die *in vitro* hergestellt worden war (s. 3.2.4.2).

Gelelektrophorese

Zuerst erfolgte die Herstellung eines Formaldehydgels (1%), das aufgekocht und in eine mit einem Kamm bestückte RNase freie Gelelektrophoresekammer (Biometra, Göttingen) eingefüllt wurde.

1% Gel:

- DEPC-H₂O: 43,4 ml
- Agarose: 0,5 g

aufkochen, auf 60°C abkühlen lassen, unter dem Abzug Zugabe von:

- 10 x MOPS: 5 ml
- Formaldehyd: 1,6 ml

Die vollständige Polymerisierung war nach einer Stunde erreicht. Als Laufpuffer diente ein 1x MOPS Puffer. Die RNA wurde auf Eis aufgetaut, um Degradationsprozesse zu reduzieren. Neben den RNA-Proben aus Infektions- bzw. Transfektionsexperimenten wurden 2-3 μ l eines digoxigeninmarkierten RNA Größenmarkers (RNA Molecular Weight Marker I DIG labeled 0,3-6,9 knt; Roche, Mannheim) und je nach gesuchtem Zielfragment in Bidest verdünnte, unmarkierte RNA als Hybridisierungskontrolle aufgetragen. 2 bis 10 μ g RNA wurden in Ladepuffer in doppeltem Volumen suspendiert. Zur Denaturierung der RNA erfolgte eine Inkubation der Proben bei 65°C für 10 Minuten im Wasserbad.

Ladepuffer:

- Formamid (deionisiert): 250 μ l
- 37% Formaldehyd: 83 μ l
- 10 x MOPS: 50 μ l
- 100% Glycerol: 50 μ l
- 2,5% Bromphenolblau: 10 μ l

Das polymerisierte Gel wurde mit 1 x MOPS Laufpuffer übergossen und zur Äquilibrierung bei ~5 V/cm Elektrodenabstand an ein Spannungsfeld angeschlossen. Eine dreißigminütige

Gelvorlaufphase schuf optimale Voraussetzungen für die RNA Auftrennung, bevor mit der Probenbeladung begonnen wurde. Die nach Hitzeinkubation auf Eis gehaltenen Proben konnten nun in die Geltaschen appliziert und der Gellauf bei konstanten Bedingungen zwischen 3-4 V/cm durch Anschluss an ein Spannungsgerät (Biometra, Göttingen) gestartet werden. Ein Durchmischen des Laufpuffers während des Laufs vermied einen Puffer- und pH-Gradienten. Eine ausreichende Auftrennung war etwa 3 Stunden nach Beladung erreicht, wenn die Bromphenolblau-Farbfront einen Abstand von einem Zentimeter vom Ende des Gels aufwies. Die Kontrolle einer gleichmäßigen Auftrennung, Quantität und Qualität der RNA erforderte eine Visualisierung im UV-Licht mittels Ethidiumbromid. Hierzu wurde das Gel 30 Minuten in Laufpuffer mit Ethidiumbromid einer Konzentration von 0,25-0,5 µg/ml inkubiert. Das Gel wurde unter UV-Licht exponiert und zur Entfernung des im Gel vorhandenen Formaldehyds in 20 x SSC-Puffer zweimal 15 Minuten gewaschen. Zur Blotvorbereitung wurde Whatman® Blotpapier auf die Gelgröße zurechtgeschnitten und die positiv-geladene Nylonmembran (Hybond H+, Roche, Mannheim) in DEPC-Bidest angefeuchtet. Der Blot erfolgte in der Orientierung und Lage des Gellaufs.

Blot, Crosslink und Hybridisierung

Eine Vakuumkammer (VacuGenXL, Pharmacia) diente der Verkürzung der Blotdauer und Verbesserung des RNA-Transfers. Auf die Oberfläche wurde eine mit DEPC-Wasser angefeuchtete positiv geladene Nylonmembran (Hybond H+, Roche, Mannheim) verbracht und das Gel luftblasenfrei auf der Membran platziert. Eine Plastikmaske deckte nicht verschlossene Bereiche der Oberfläche ab. Der Blotpuffer konnte auf das Gel aufgebracht und das Vakuum angelegt werden. Das Vakuum betrug anfangs 80 mbar, danach 60 mbar. Der Blot dauerte 2 Stunden. Blotpuffer wurde auf der Oberfläche beständig nachgefüllt.

Nach dem Blot erfolgte eine Fixierung der RNA auf der Membran durch Exposition auf einer in 2 x SSC Puffer angefeuchteten Lage Whatman® Papier in einem Crosslinker (1.200 µJ) mittels UV-Bestrahlung. Das geblottete Gel wurde unter UV-Licht auf vollständigen Transfer der RNA kontrolliert. Die Zugabe von ca. 15 ml erwärmtem Prähybridisierungspuffer und Inkubation für mindestens 30 Minuten in einem Hybridisierungsröhrchen unter ständigem Drehen in einem Hybridisierungsofen äquilibrierte die Membran. Die Temperatur der Prähybridisierung und Hybridisierung betrug zwischen 37 und 42°C, je nach Länge und GC-Gehalt der DNA-Sonde. Für die Prähybridisierung und Hybridisierung fanden hierbei in DEPC-Wasser gelöste DIG Easy Hyb Granules der Firma Roche als Pufferlösungen Verwendung. 100 ng/ml der Digoxigenin-markierten Sonde wurden in 50 µl RNase-freies Wasser pipettiert, 5 Minuten im kochenden Wasserbad denaturiert und ca. 12 ml

vorgewärmter Hybridisierungslösung zugesetzt. Nach Entfernung der Prähybridisierungslösung wurde die Hybridisierungslösung auf die Membran gegeben und bis zu 16 Stunden in einem Hybridisierungsofen gedreht.

Visualisierung und Membranstripping

Zur Visualisierung des Blots fand das DIG Wash and Block Buffer Set von Roche nach Herstelleranweisung Verwendung. Nach der Hybridisierung wurde die Sondenlösung verworfen und die Membran mit 30 ml eines Niedrigstringenzpuffers (2 x SSC mit 0,1% SDS) bei Raumtemperatur zweimal 5 Minuten inkubiert. Danach erfolgte eine zweimalige Inkubation in 68°C temperiertem Hochstringenzpuffer (0,1 x SSC mit 0,1% SDS) für 15 Minuten. 100 ml Waschpuffer stellten in einer zweiminütigen Inkubation ideale Bedingungen für die nachfolgende Blockierungsreaktion ein. Diese wurde mit 100 ml für 30 Minuten in frisch angesetztem 1 x Blockpuffer durchgeführt. Als Antikörper diente ein gegen die Digoxigeninmarkierung der Sonde gerichteter Anti-Digoxigenin-AP-Antikörper, der 1:10.000 (75 mU/ml) in 20 ml Blockierungslösung verdünnt und für 30 Minuten auf die Membran gegeben wurde. Zwei viertelstündige Waschschrte mit 100 ml Waschpuffer schlossen sich an. Eine Inkubation in 20 ml Detektionspuffer für 3 Minuten äquilibrierte die Membran für die Visualisierung, zu der die Membran auf eine Einschweißfolie gelegt, mit ready-to-use CDP-Star-Lösung beträufelt (ca. 1 ml Lösung pro 100 cm² Membran), 5 Minuten in Dunkelheit inkubiert und luftblasenfrei eingeschweißt wurde. In einer Röntgenfilmkassette fixiert, konnte der Blot auf einem lumineszenz sensitiven Röntgenfilm (Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film, Roche, Mannheim) visualisiert werden. Je nach Signalintensität betrug die Expositionszeit zwischen 2 Minuten und 2 Stunden. Die Belichtung des Films fand in einem Filmentwickler (Entwickler Curix 60, AGFA) statt.

Ein Abwaschen der angehefteten Sonde erlaubte einen wiederholten Einsatz des Blots, wenn die mit RNA beladene Membran z.B. auf die Existenz mehrerer Gentranskripte überprüft oder eine Standardisierung auf das Kontrollgen β -Aktin vorgenommen werden sollte. Die Membran wurde mit 100 ml kochender 0,1%iger SDS-Lösung übergossen, für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und mit RNase freiem Wasser gespült. Eine Äquilibrierung des Blots in einer fünfminütigen Inkubation mit Maleinsäurepuffer ermöglichte die erneute Prähybridisierung.

3.2.8 DNA

3.2.8.1 Extraktion aus Zellkulturzellen und Konzentrationsmessung

Hierbei erfolgte die DNA-Präparation unter Verwendung des DNeasy Tissue Kits von Qiagen. Die in PBS gewaschenen Zellen wurden in einem Volumen von 200 µl mit Lysispuffer AL und Proteinase K versetzt und 10 Minuten bei 60°C inkubiert. Die weitere Behandlung schloss die Zugabe von 200 µl Ethanol (100%), Bindung der DNA an die Säule und Waschschrte mit je 500 µl der Puffer AW1 und AW2 ein. Die Elution der DNA von der Silikamembran geschah in Tris-haltigem Puffer AE.

Konzentrationsmessung am Spektrometer

Nukleinsäuren absorbieren Licht einer Wellenlänge bei einem Maximum von 260 nm bis 280 nm. RNA besitzt ein von DNA gering abweichendes Absorptionsmaximum. Das Absorptionsspektrum und der Quotient der Werte 260/280 lassen Beurteilungen über die Nukleinsäure, Qualität und Quantität zu. Die Proben wurden 1:50 in Bideest verdünnt und gegen den Wasserleerwert in einer Küvette gemessen.

Konzentrationsmessung am Fluorometer

Ein mit der DNA-Doppelhelix interkalierender Fluoreszenzfarbstoff (Hoechst 33258) emittiert bei einer Wellenlänge von 461 nm UV-Licht. Je nach Fluoreszenzintensität konnte nach Verdünnung von 1:1.000 (2 µl DNA-Probe in 2 ml Messlösung) auf den in der Messlösung vorhandenen DNA-Gehalt geschlossen werden. Die Messlösung allein diente als Nullreferenz, eine Standardverdünnung definierter Konzentration von Kalbsthymus-DNA (120 ng/µl) als Eichlösung. Diese Methode fand vor allem bei niedrig konzentrierten Proben Anwendung.

Konzentrationsmessung in der Gelelektrophorese

Im Vergleich mit standardisierten Größenmarkern konnte die ungefähre Konzentration der Probe in der agarosegelelektrophoretischen Auftrennung abgeschätzt werden. Die in der Intensität gleiche Bande des Größenmarkers wurde herangezogen, um durch die eingesetzten Volumina und Konzentrationen die Probenmenge zu berechnen.

3.2.8.2 DNA-Modifikationen

Restriktionsendonukleasen

Bakterieneigene Enzyme erkennen DNA einer jeweils enzyspezifischen Sequenz und schneiden den Doppelstrang entweder glatt (blunt end) oder mit Überhang gegeneinander versetzt (sticky end) an der Phosphodiesterbindung. Die Erkennungssequenz besteht aus vier

bis acht Nukleotiden und zeigt meist eine Palindromstruktur, die bei beiden komplementären Strängen in 5'-3' Leserichtung dieselbe Basenreihenfolge ergibt. Nach Definition setzt 1 Unit (U) Restriktionsenzym 1 µg Substrat in einer Stunde bei 37°C unter optimalen Reaktionsbedingungen um. Die Höchstmenge an zugesetztem Enzym beträgt ein Zehntel des Reaktionsvolumens. Die Inkubationsdauer des Reaktionsansatzes betrug bei *EcoRI* 1 Stunde. *SacI*, *SacII* und *PstI* -Reaktionen wurden über Nacht inkubiert.

Restriktionsansatz:

- | | |
|-----------------------------------|----------|
| • DNA | 1 µg |
| • Enzym | 1 U |
| • Puffer (10 x) | 1 µl |
| • Bovines Serum Albumin (1 mg/ml) | 1 µl |
| • Bidest | ad 10 µl |

Alkoholfällung

Nukleinsäuren präzipitieren in Anwesenheit monovalenter Kationen höherer Konzentration (0,2-0,5 M) und Alkohol. Zentrifugation pelletiert das Präzipitat, das ein Waschschrift mit Alkohol (70%) von überschüssigen Salzen befreit.

Fällungsansatz:

- | | |
|-----------------------------|-----------|
| • DNA | x µl |
| • Natriumacetat 5 M, pH 5,2 | 10 µl |
| • Bidest | ad 100 µl |
| • Ethanol 100% | 250 µl |

Der Ansatz wurde gemischt und 45 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert (Eppendorf 5415C), mit Ethanol (70%) gewaschen und zentrifugiert. Das DNA-Pellet trocknete in einer SpeedVac Zentrifuge (Savant, Hicksville) und wurde dann in Bidest oder Tris-haltigem Puffer aufgenommen.

Gelextraktion

Gewünschte DNA-Banden wurden nach Auftrennung in der Gelelektrophorese mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits der Firma Qiagen oder des Perfect Prep® Gel Cleanup Kits von Eppendorf aus dem Agarosegel zur weiteren Verwendung isoliert. Die Fragmente wurden nach Visualisierung im UV-Licht bei 354 nm mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten, gewogen, in einem entsprechendem Volumen Puffer QG bzw. Bindepuffer bei 50°C gelöst, auf die Säule aufgebracht und dort gebunden. Die Reinigung erfolgte durch

verschiedene Waschschrirte je nach Herstelleranleitung. Die DNA wurde mit Elutionspuffer oder Bidest eluiert.

Säulenaufreinigung

DNA-Fragmente mussten für nachfolgende Reaktionen wie z.B. die Sequenzierung von Nukleotiden, Salzen und Polymeraserückständen befreit werden. In Puffer TE prääquiliibrierte Sephacryl-Säulen fanden hierbei Verwendung. Nach Abzentrifugation des Puffers bei 3000 rpm für 1 Minute in einer Tischzentrifuge (Eppendorf 5415C), war die Beladung der Säule mit dem Reaktionsgemisch möglich. Ein weiterer Zentrifugationsschritt für 2 Minuten bei 3000 rpm hielt die störenden Fragmente in der Säulenmatrix zurück, die gereinigten Amplifikate konnten im Durchfluss aufgefangen werden.

Ligation

Das Enzym T4 Ligase verknüpft kovalent freie 5'-Phosphate der DNA-Enden und bewirkt den Ringschluss linearer DNA. Bei der Klonierung wurde ein DNA-Fragment mit einem linearisierten Vektor im Ringschluss entweder über Überhangenden (sticky ends) oder glatte Enden (blunt ends) ligiert. Um eine effiziente Ausbeute an DNA-Vektor Verbindung zu erhalten, musste das stöchiometrische Verhältnis einer gerichteten Klonierung 1:1, einer blunt end Ligation Vektor:Insert zwischen 1:3 und 1:5 betragen. Die eigentliche Reaktion fand in möglichst kleinem Volumen statt. Das Endvolumen setzte sich aus einem Zehntel T4-Ligasepuffer, 2 µl (400 U/µl) T4-Ligase und DNA in Bidest zusammen. Die Reaktion fand bei 16°C über Nacht oder in einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur statt. Ein Aliquot wurde zur Überprüfung in der Gelelektrophorese analysiert.

3.2.8.3 Transformation und Klonierung mit dem TOPO TA® Vektor

DNA-Fragmente aus Differential Display, RACE- oder RT-PCR wurden durch Ligation in Plasmide integriert und als Vektoren in Wirtsbakterien transformiert.

Der Vektor des TOPO TA Cloning® Kits von Invitrogen besitzt im linearisierten Zustand einen Thyminüberhang. Dieser geht als komplementäre Zielbase zu den mittels TaqPolymerase erzeugten 3'-Adeninüberhängen (terminale Transferase-Aktivität) der PCR Amplifikate Wasserstoffbrückenbindung ein. Topoisomerase I aus dem Vaccinia Virus ist kovalent mit dem reaktiven Ende des linearisierten Vektors verbunden und ligiert die Fragmente. Als Selektionsmarker befinden sich Antibiotikaresistenzen auf dem Vektor. Des Weiteren erlaubt das verwendete Plasmid diverse Modifikationen und Anwendungen wie z.B. Endonukleaseverdau, Sequenzierung und DNA- bzw. RNA-Synthesen. Selektion von Insert-

tragenden Vektoren ist durch die Anwesenheit des α -Fragments des *lacZ*-Gens innerhalb der multiplen Klonierungsstelle (multiple cloning site, MCS) möglich. Dieses N-terminale Fragment alleine besitzt keine Aktivität, kann jedoch das c-terminale ω -Fragment der Wirtszelle komplementieren (α -Komplementation). Wird das plasmidale *lacZ*-Fragment durch erfolgreiche Insertion nicht exprimiert, bleibt auch das bakterielle Genfragment inaktiv, die Bakterienzellen erscheinen auf dem X-Gal haltigen Nährboden als weiße Kolonien. Geschieht der Ringschluss des Plasmids ohne Einbau fremder DNA, ist das Vektor-Fragment aktiv und kann X-Gal mit Hilfe des bakteriellen Fragments als Substrat umsetzen. Dies induziert eine Blaufärbung der Bakterienkolonie.

Je nach Konzentration des zu klonierenden Fragmentes wurden 1-4 μ l eingesetzt und mit 1 μ l Salzlösung sowie mit 1 μ l des Vektorprämixes zwischen 5 und 45 Minuten inkubiert. Ein 2 μ l Aliquot wurde zu den auf Eis aufgetauten, kompetenten Zellen (TOP10 One Shot® E.coli) pipettiert und für bis zu 30 Minuten auf Eis gehalten. Nach Hitzeschock der Zellen bei 42°C für 30 Sekunden, sofortigem Kühlen auf Eis und Zugabe von zimmerwarmem SOC Medium, wurde während einer einstündigen Schüttelinkubation bei 37°C das Resistenzgen exprimiert. Nach Transfer von 50 bzw. 150 μ l der Zellsuspension auf Nährboden (LB-Selektionsnährmedium mit Ampicillin 100 μ g/ml, 40 μ g/ml X-Gal) wurde dieser über Nacht bei 37°C bebrütet. Die weißen Bakterienkolonien wurden in 5 ml LB-Medium mit 100 μ g Ampicillin pro ml überführt und bei 37°C 12-16 Stunden inkubiert. Die Plasmide wurden aus den Bakterien reisoliert und in einem Restriktionsverdau auf die erfolgreiche Insertion des DNA-Fragments überprüft. Insert-tragende Plasmide wurden über Säulen aufgereinigt und einer Konzentrationsbestimmung unterzogen.

3.2.8.4 Vektoraufreinigung

Für Plasmidpräparationen wurde der QIAprep® MiniPrep Kit von Qiagen nach Herstelleranleitung verwendet. Die Methode der Adsorption von DNA an eine Silikagelmembran basiert auf der modifizierten alkalischen Lyse nach Birnboim (Birnboim & Doly, 1979). Nach Zentrifugation (10.000 rpm, 10 min, Eppendorf 5415C) von 2-4 ml der Bakterienkultur und Resuspension des Pellets in Puffer P1 (250 μ l) erfolgte mit Zugabe des Puffers P2 (250 μ l) die alkalische Lyse mit Freisetzung der Plasmid-DNA. Zellbestandteile und chromosomale DNA wurden durch im Puffer befindliche Natronlauge denaturiert. Puffer N3 (350 μ l) neutralisierte die Reaktion nachfolgend und begünstigte die Bindung der DNA an die Silikamatrix durch erhöhte chaotrope Salzkonzentration und einhergehende Modulation der Hydrathülle um die DNA. Zuvor mussten unerwünschte Zelltrümmer, chromosomale

DNA sowie Proteine in einem Zentrifugationsschritt 10 Minuten bei 13.000 rpm präzipitiert werden. Die Säule wurde mit plasmidhaltigem Überstand beladen und durch Vakuumanschluss über die Silikagelmatrix gesaugt. DNA band an das Säulenmaterial und wurde durch verschiedene Waschstufen mit Puffer PB und PE (je 1 ml) von RNA und sonstigen Metaboliten befreit. Puffer EB (100 µl) eluierte das Plasmid. Eine anschließende kurze Vakuumzentrifugation entfernte Ethanolreste. Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte im Spektrometer.

3.2.8.5 Virus-DNA

Mittels gentechnischer Methoden war es möglich, das Genom der Circoviren von 1759 bzw. 1768 Nukleotiden im Labor herzustellen. Vektoren trugen das Genom entweder vollständig (pSK144) oder modifiziert mit duplizierten Überhängen (pIC1, pIC2, pPCV2). Die DNA konnte in Bakterienzellen in größerem Umfang vervielfältigt und anschließend aufgereinigt werden. Ein Restriktionsendonukleaseverdau schnitt das Virusgenom aus dem Vektor heraus. Eine Ligase überführte dieses in den zirkulären Zustand. Alternativ wurden Plasmide mit Überhang eingesetzt, der durch ein Rekombinationsereignis die Infektion von Zellkulturzellen ermöglichte.

3.2.9 PCR

3.2.9.1 Methode

Mit Hilfe der PCR lassen sich bestimmte Bereiche einer beliebigen DNA als Template gezielt vervielfältigen (Mullis et al., 1986). Das Prinzip der PCR basiert auf der Trennung des DNA-Doppelstranges (dsDNA) in zwei Einzelstränge (ssDNA) durch Hitze (Denaturierung). Darauf folgt die Anlagerung sequenzspezifischer Oligonukleotide, sogenannter Primer, an die homologen Bereiche der ssDNA (Annealing) und die anschließende DNA-Synthese durch eine thermostabile DNA-abhängige DNA-Polymerase. Diese verlängert in Gegenwart freier dNTPs die Primer (Elongation) und synthetisiert den zu dem ssDNA-Molekül komplementären Strang. Die neusynthetisierte DNA dient in dem nachfolgenden Zyklus selbst wieder als Template. Mit jedem Durchlaufen eines Zyklus wird die Anzahl der DNA-Moleküle exponentiell amplifiziert (2^n bei n Zyklen).

Die Standardreaktion der 25 µl Ansätze fand in dünnwandigen PCR-Röhrchen (0,2 ml) in einem Thermocycler (Perkin Elmer Gene Amp® 2400, 9600 oder Biometra TGradient 96) statt. Eine Amplifikation erfolgte stets an 150 ng Probenmaterial. Überstände aus Zellkulturen

mussten mindestens 1:10 verdünnt werden. Die eingesetzten Primer und deren Schmelztemperaturen sind im Anhang aufgelistet.

Standardprotokoll:

• Puffer (10 x ohne MgCl ₂)	2,5 µl
• Primerpaar (10 µM, 1 µM final)	2,5 µl
• MgCl ₂ (2,5 mM final)	2 µl
• DMSO (5%)	1,25 µl
• dNTP (200 µM each)	0,5 µl
• AmpliTaq (5 U/µl, 0,7 U final)	0,15 µl
• DNA (ad 150 ng)	x µl
• Bidest	ad 25 µl

Standardthermocyclerprogramm:

95°C	15:00 min		Aktivierung der Polymerase
94°C	00:15 min	} 40-45x	Denaturierung Primeranlagerung (Annealing) DNA-Synthese (Elongation)
x°C	00:30 min		
72°C	00:30 min		
72°C	10:00 min		Strangverlängerung

x = Primerspezifische Temperatur, siehe Anhang

3.2.9.2 Nested-PCR

Um eine ausreichende Menge spezifischen Genprodukts zu erhalten, war es gelegentlich nötig, die PCR mit zwei verschiedenen Primerpaaren in zwei Läufen nacheinander zu unternehmen. Das Primerpaar der ersten Runde amplifizierte ein größeres Fragment. In der zweiten Runde erzeugte ein nach innen versetztes Primerpaar ein kleineres Fragment. So konnte unter Ausnutzung eines Kaskadeneffektes ein hoher Sensitivitätsgrad gewährleistet werden. Der Erstrundenreaktionsansatz enthielt standardisiert 150 ng DNA. Als Ausgangsmenge für die zweite Reaktion wurde 1 µl des 25 µl Ansatzes der ersten PCR eingesetzt. Die Temperatur der Primerschmelztemperatur wurde angepasst, die Reaktionsbedingungen blieben konstant.

3.2.9.3 Seminested-PCR

Bei dieser Variante der nested-PCR wurde entweder der Sense- oder der Antisenseprimer der ersten Runde auch für die zweite Runde eingesetzt und nur der zweite Primer nach innen versetzt, d.h. das Endprodukt wurde im Vergleich zur ersten Runde lediglich an einer Seite verkürzt amplifiziert.

3.2.9.4 RT-PCR

Bei der RT-PCR diente aus RNA synthetisierte cDNA als Matrize der Reaktion.

Die cDNA wurde bis zu 1:240 verdünnt und in der PCR eingesetzt.

3.2.9.5 RACE-PCR

Mittels RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends) Technik kann das komplette Transkript eines Gens amplifiziert werden (Abb. 3.1). An die 3'-mRNA Region mit der Struktur des polyA-Anhangs wurden geeignete komplementäre Adaptoren angelagert, die der reversen Transkriptase als Startsignal zur cDNA Synthese dienten. Gegen den Adapter gerichtete Primer amplifizierten zusammen mit genspezifischen Primern das 3'-Fragment des Gens in einer nested- oder seminested-PCR. Spezifische Modifizierungen machten das von der CAP-Struktur geschützte 5'-Ende zugänglich. Nachfolgend fand eine Ligation eines primerbindenden Adapters statt. Eine PCR amplifizierte von bekannten 3'-Strukturen mit genspezifischen Primern in die unbekannte Sequenz mittels Adapterprimer. Erhaltene Produkte wurden in den pCR2.1 Vektor mittels TOPO TA Cloning® kloniert.

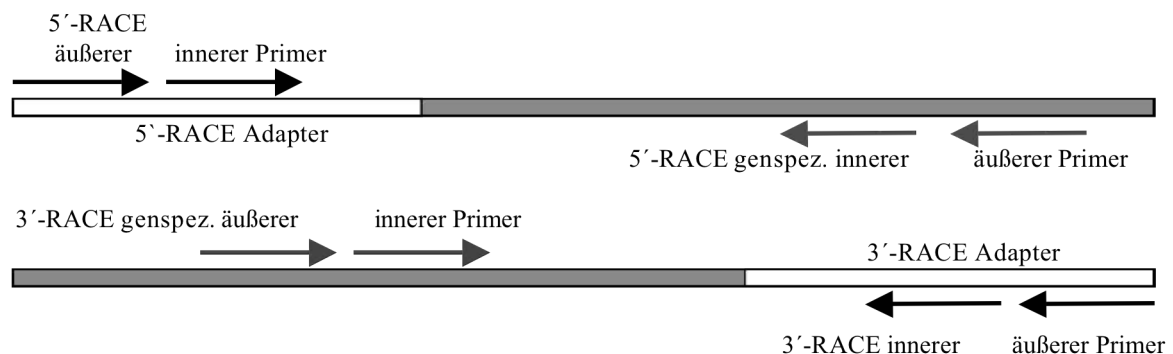


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der 3'- und 5'-RACE-PCR mit gen- und adapterspezifischen Primern. Die ligierten Adapter sind hell dargestellt.

3'-RACE

Die Gesamt-RNA wurde durch Zugabe eines den polyA-Anteil erkennenden Adapters in cDNA mittels reverser Transkriptase umgeschrieben. Zur Analyse des 3'-Endes des Zielgens in der cDNA wurden nested- oder seminested-PCR Reaktionen mit genspezifischen Primern und Adapterprimern durchgeführt. Die Annealingtemperatur richtete sich nach dem genspezifischen Primer.

Reverse Transkription :

1 µg RNA

- dNTP Mix 4 µl
- 3'-RACE Adapter 2 µl
- 10 x RT Puffer 2 µl

- RNase Inhibitor 1 µl
- M-MLV reverse Transkriptase 1 µl
- RNA/Bidest ad 20 µl

Mischen, 1 Stunde bei 42°C inkubieren, Lagerung bei -20°C

1. Amplifikationsrunde 3'-RACE-PCR mit äußerem Primerpaar:

- RT-Reaktion 1 µl
- 10 x PCR Puffer 5 µl
- dNTP-Mix 4 µl
- 3'-Race genspezif. Primer (10 µM) 2 µl
- 3'-RACE äußerer Primer 2 µl
- TaKaRa Ex Taq™ 1 µl
- Bidest ad 50 µl

2. Replikationsrunde 3'-RACE-PCR mit innerem Primerpaar:

- 1. Runde 3' RACE PCR-Reaktion 1 µl
- 10 x PCR Puffer 5 µl
- dNTP-Mix 4 µl
- 3'-Race genspezif. Primer (10 µM) 2 µl
- 3'-RACE innerer Primer 2 µl
- TaKaRa Ex Taq™ 1 µl
- Bidest ad 50 µl

5'-RACE

Die RLM-RACE (RNA Ligase Mediated Rapid Amplification of cDNA Ends) ließ die ausschließliche Amplifikation von Vollängentranskripten zu. Zuvor wurde das Nukleinsäuregemisch aus ribosomaler RNA, fragmentierter mRNA, tRNA und genomischer DNA mit Phosphatase aus Kälberdarm (CIP, Calf intestinal phosphatase) behandelt, die von allen Molekülen die Phosphatgruppe am 5'-Ende entfernte, die nicht durch eine CAP-Struktur geschützt waren. Demzufolge standen nur noch die mit der CAP-Gruppe versehenen mRNA-Moleküle für die Ligation zur Verfügung. 10 µg eingesetzte Gesamt-RNA wurde für 1 Stunde bei 37°C mit CIP inkubiert, um freie 5'-Phosphatenden zu entfernen.

CIP Behandlung:

10 µg Gesamt-RNA

- 10 x CIP Puffer 2 µl
- CIP 2 µl
- RNA/Bidest ad 20 µl

Mischen, Inkubation 1h bei 37°C

Eine Phenolisierung des Reaktionsansatzes reinigte Nukleinsäuren von Proteinen und entfernte damit das zugesetzte Enzym. Der CIP behandelten RNA wurden zugesetzt:

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

Dieses Gemisch wurde gevortext und die Phasen bei >10.000 g 5 Minuten bei 20°C separiert. Der oberen wässrigen Phase wurden 150 µl Chloroform zugesetzt, diese wiederholt gevortext und die Phasen durch Zentrifugation 5 Minuten bei 20°C und >10.000 g (Heraeus, Omnifuge 2.0RS) getrennt. Die obere wässrige Phase enthielt die RNA. Durch die Zugabe von 150 µl Isopropanol und gründlichen Vortexens sowie einer zehnminütigen Inkubation auf Eis wurde die RNA gefällt. Pelletierung erfolgte bei 4°C 20 Minuten bei maximaler Drehzahl. Es wurden 500 µl 70% Ethanol (kalt) gewaschen und wiederum bei 4°C 5 Minuten mit maximaler Drehzahl pelletiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet getrocknet und in 11 µl Bidest aufgenommen. Diese CIP-behandelte RNA unterlag einer weiteren Modifikation, in der TAP (Tobacco Acid Pyrophosphatase) die CAP-Struktur entfernte. Die TAP Reaktion fand bei 37°C für 1 Stunde statt.

TAP-Behandlung:

- CIP-behandelte RNA 5 µl
- 10 x TAP Puffer 1 µl
- TAP 2 µl
- Bidest ad 10 µl

Die TAP-Behandlung führte dazu, dass die mRNA ein freies 5'-Phosphat erhielt, das einer Ligationsreaktion zugänglich war. T4-Ligase ligierte einen spezifischen 45 Basenpaar großen Oligonukleotidadapter an das 5'-Ende der mRNA. Inkubiert wurde 1 Stunde bei 37°C.

Ligation:

- CIP/TAP-RNA 2 µl
- 5'-RACE-Adapter 1 µl
- 10 x Ligase Puffer 1 µl
- T4-Ligase (2,5 U/µl) 2 µl
- Bidest ad 10 µl

In einer reversen Transkriptionsreaktion konnte die modifizierte mRNA mittels randomisierter Primer in cDNA umgeschrieben werden.

Reverse Transkription:

- Ligierte RNA 2 μ l
- dNTP Mix 4 μ l
- Randomisierte Decamerprimer 2 μ l
- 10 x RT Puffer 2 μ l
- RNase Inhibitor 1 μ l
- M-MLV reverse Transkriptase 1 μ l
- Bidest ad 20 μ l

Die cDNA Synthese erfolgte bei 42°C in einer einstündigen Inkubation. Aus diesem Reaktionsgemisch konnte in einer nested-PCR mit gen- und adapterspezifischen Primern das 5'-Ende des gesuchten Gens amplifiziert werden. Ein Aliquot der cDNA wurde für die Amplifikation des 5'-Endes in der ersten Runde einer nested-PCR Reaktion mit gen- und adapterspezifischen Primern eingesetzt. In diesen Reaktionen fanden 2 Primerpaare Anwendung, die gegen den Adapter sowie spezifisch gegen die ausgewählte Gensequenz gerichtet waren.

1. Runde 5'-RACE-PCR mit äußerem Primerpaar:

- RT-Reaktion 1 μ l
- 10 x PCR Puffer 5 μ l
- dNTP Mix 4 μ l
- 5'-RACE genspezif. Primer (10 μ M) 2 μ l
- 5'-RACE äußerer Primer 2 μ l
- TaKaRa Ex Taq™ 1 μ l
- Bidest ad 50 μ l

2. Runde 5'-RACE-PCR mit innerem Primerpaar:

- 1. Runde 5'-RACE PCR-Reaktion 1 μ l
- 10 x PCR Puffer 5 μ l
- dNTP-Mix 4 μ l
- 5'-RACE genspezif. Primer (10 μ M) 2 μ l
- 5'-RACE innerer Primer 2 μ l
- TaKaRa Ex Taq™ 1 μ l
- Bidest ad 50 μ l

Für die 2. Runde der nested-PCR wurde 1 μ l der ersten Reaktion eingesetzt.

Thermocyclerprogramm für beide Analysen:

94°C	10:00 min		
96°C	00:30 min	}	35x
x°C	00:30 min		
72°C	02:30 min		
72°C	07:00 min		

x = Primerspezifische Temperatur, siehe Anhang

Die Elongationszeit richtete sich nach der gesuchten Transkriptlänge.

3.2.9.6 DNA-Sondenherstellung

Zur Etablierung eines nicht-radioaktiven Northern Blots wurden die klonierten Differential Display-Fragmente mittels PCR mit dem PCR DIG Probe Synthesis Kit von Roche (Roche, Mannheim) markiert. In einer PCR Reaktion wurden digoxigeninmarkierte Nukleotide in den komplementären DNA-Strang eingebaut. Durch die Markierung zeigte das Produkt im Spannungsfeld der Gelelektrophorese. Als Matrize der Reaktion dienten die in den Vektor pCR2.1 klonierten cDNA-Fragmente des Differential Display-Produktes. Mit vektorspezifischen Primern in Sense- und Antisense-Richtung ließen sich die gewünschten Sonden mittels PCR generieren. Kontrollreaktionen wurden ohne Digoxigeninmarkierung durchgeführt (DIG-).

DIG-PCR-Ansatz:

	<u>+DIG</u>	<u>-DIG</u>
• Plasmid-DNA (~50 pg)	x µl	x µl
• PCR-Puffer mit MgCl ₂ , 10 x	5 µl	5 µl
• PCR DIG-Mix, 10 x	2,5 µl	-
• dNTP stock solution, 10 x (200 µM)	2,5 µl	5 µl
• Primer forward (1 µM)	1 µl	1 µl
• Primer reverse (1 µM)	1 µl	1 µl
• Enzymmix, Expand High Fidelity (2,6 U total)	0,75 µl	0,75 µl
• Bidest	ad 50 µl	ad 50 µl

Thermocyclerbedingungen:

95°C	2:00 min		
95°C	0:30 min	}	10 x
55°C	0:30 min		
72°C	0:40 min		

95°C	0:30 min	} 20 x
55°C	0:30 min	
72°C	0:40 min	
<hr/>		+20 sek pro Zyklus
72°C	7:00 min	

3.2.10 Agarosegelelektrophorese

Agarose bildet ein Gel, das je nach Konzentration unterschiedliche Porengröße besitzt. Diese Eigenschaft wird in der Agarosegelelektrophorese benutzt, um Nukleinsäuren aufzutrennen. Die Porengröße beeinflusst die Mobilität der negativ geladenen Nukleinsäuren in der Elektrophorese und ermöglicht damit eine Auftrennung der Fragmente nach der Größe. Die Diffusionsgeschwindigkeit verhält sich umgekehrt proportional zu dem \log_{10} der Anzahl der Basenpaare. Zur Anfärbung der DNA werden Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt, die in die DNA-Doppelhelix interkalieren und diese im UV-Licht sichtbar machen. Zur Gelherstellung wurde Agarose in Laufpuffer durch Aufkochen gelöst und nach Abkühlung in eine Gelkammer (Biometra, Göttingen) eingefüllt. Ein eingetauchter Kamm bildete nach Erkalten des Gels Taschen aus. Der Kamm wurde nach Überschichten des Gels mit Laufpuffer entfernt, wobei diese Vertiefungen die mit Ladepuffer versehenen Proben aufnahmen. Je nach aufzutrennender Fragmentgröße wurden Agarosekonzentrationen zwischen 0,7 und 2% verwendet. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei konstanter Spannung von 6-8 V pro cm Elektrodenabstand.

3.2.11 Real-time PCR

3.2.11.1 TaqMan® PCR

Die real-time PCR ermöglicht quantitative Aussagen über die ursprünglich in einer Probe vorhandene Kopiezahl eines Fragmentes. Hierzu wird eine sequenzspezifische Hybridisierungsprobe verwendet, deren Zielsequenz zwischen den beiden Primern liegt und mit zwei unterschiedlichen Fluorophoren versehen ist. Die räumliche Nähe der an die Sonde gekoppelten beiden Fluoreszenzfarbstoffe unterdrückt bei Anregung durch Laserlicht ein Fluoreszenzsignal durch Frequenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) zwischen Reporter (Fluorescein-Derivat) und Quencher (Rhodamin-Derivat). Nach Bindung der Sonde an die DNA wird die Sonde bei der Strangverlängerung durch die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase in einzelne Nukleotide hydrolysiert. Reporter und Quencher separieren und der Reporter kann detektiert werden (Wellenlänge 488 nm, (Livak et al., 1995)). Das TaqMan® Gerät GenAmp®5700 Detection System von Applied Biosystems misst parallel zum PCR-

Lauf die ausgesendete Emissionsstärke in Echtzeit (real-time-PCR). In einer idealen PCR verdoppelt sich die DNA-Menge pro Zyklus. Über das ausgesendete Signal lässt sich der Zeitpunkt bzw. die Zykluszahl bestimmen, bei der die Menge an amplifizierter DNA, d.h. ausgesendeter Fluoreszenz, einen gesetzten Schwellenwert (C_T , Thresholdcycle) überschreitet. Bei hoher Kopienzahl ist der Schwellenwert schnell erreicht, die Anzahl der Zyklen entsprechend niedrig. Eine Verdünnungsreihe bekannter Konzentration der Zielsequenz dient zur Standardisierung der in der Probe vorhandenen Menge an DNA. Als passiver Referenzfarbstoff wird ROX der Reaktion zugesetzt, dessen Grundfluoreszenz Abweichungen der Probenfluoreszenz ausgleicht.

Eine PCV-spezifische real-time PCR zur Detektion von PCV1 und PCV2 in Schweineproben wurde angewendet, um die Kopiezahl in infizierten Zellen und Überständen zu messen.

β -Aktin Standardisierung

Sowohl zur Überprüfung der Amplifizierbarkeit als auch zur Standardisierung der Menge an zellulärer DNA wurde eine real-time PCR für das β -Aktin eingesetzt. Hierzu wurde dasselbe Volumen wie zur Detektion viraler DNA eingesetzt. Für die PCR wurde der TaqMan® Universal Master Mix von Applied Biosystems in der Hälfte der empfohlenen Konzentration Anwendung, diese Modifikation wurde durch entsprechende Kontrolluntersuchungen abgesichert.

Mastermixansatz:

- | | |
|--------------------------|---------------|
| • Mastermix (0,5 x) | 6,25 μ l |
| • Primer 468 s (100 nM) | 0,25 μ l |
| • Primer 468 as (300 nM) | 0,75 μ l |
| • Sonde (100 nM) | 0,25 μ l |
| • DNA/Bidest | ad 25 μ l |

Thermocyclerbedingungen:

95°C	15:00 min	
95°C	00:20 min	} 45x
68°C	01:00 min	

PCV Detektion

Die Bestimmung der PCV-Kopiezahl erfolgte mittels Primern, die spezifisch für das Capsidgen von PCV1 bzw. PCV2 waren. Überstände infizierter Zellen wurden mindestens 1:10 verdünnt. Als Standard dienten Verdünnungen in Zehnerschritten der Plasmide pSK144 für PCV1 und pIC2 für PCV2 (ausgehend von jeweils 10^8 Kopien) in Bidest mit 10 μ g/ml

λ -DNA Es wurde das TaqMan® Gerät GenAmp®5700 Detection System von Applied Biosystems eingesetzt.

Reaktionsansatz:

• MgCl ₂ (6 mM final)	12 μ l
• Puffer (10 x ohne MgCl ₂ + 1/10 ROX)	5 μ l
• Kalbsthymus (50 ng/ μ l)	2,5 μ l
• Primer forward (500 nM final)	2 μ l
• Primer backward (125 nM final)	0,5 μ l
• Sonde PCV (100 nM final)	0,5 μ l
• dNTP (200 μ M each)	0,25 μ l
• AmpliTaq Gold (5 U/ μ l)	0,25 μ l
• DNA/Bidest	ad 50 μ l

Thermocyclerbedingungen:

95°C	10:00 min	
95°C	00:20 min	} 45x
55°C	00:20 min	
72°C	00:20 min	

3.2.11.2 SYBR Green PCR

Der Farbstoff SYBR Green I besitzt DNA-bindende Eigenschaften. Er heftet sich bei der PCR-Amplifikation an entstehende Doppelstrang-DNA und sendet nach Anregung ein Fluoreszenzsignal bestimmter Wellenlänge (494 und 521 nm) aus. Ein Signal entsteht nur nach Bindung an einen Doppelstrang. Der Farbstoff wird im Gegensatz zu TaqMan® Sonden während der Reaktion nicht abgebaut, sondern steht während der gesamten Reaktion zur Verfügung. Abweichungen in der Fragmentlänge, Nukleotidvariationen des Amplifikats oder Primerdimere lassen sich mittels Schmelzkurvenanalyse differenzieren. Am Ende jedes Laufes gibt ein Temperaturgradient zwischen 65°C und 95°C die Schmelztemperatur der amplifizierten DNA des PCR-Ansatzes wieder. Spezifische Produkte gleicher Länge besitzen denselben Schmelzpunkt, wohingegen Primerdimere und unspezifische Produkte an abweichenden Schmelztemperaturmaxima erkennbar werden. Als Kontrollen dienen Wasseransätze ohne DNA zur Kontaminationserkennung, DNA-Ansätze in Bidest ohne Enzymmix zur DNA-Basisfluoreszenzdetektion und cDNA-Syntheseansätze ohne reverse Transkriptase zur Kontrolle einer DNA-Kontamination der RNA-Präparation. Eine Standardverdünnung des Vektors mit der Ziel-DNA ermöglichte über die Steigungsgerade die

Quantifizierung der unbekannt Probe. Die Gentranskripte konnten in ihrer relativen Menge zueinander sowie quantitativ in den verschiedenen Zelllinien bestimmt werden. Zur Verfügung stand der Reaktionsmix QuantiTect SYBR Green PCR von Qiagen. Als Referenzfarbstoff wurde dem Reaktionsmix ROX zugesetzt. Die Reaktion fand in einem ABI GeneAmp® 5700 Gerät statt. Als Basiskonstante der Genexpression wurde auf die β -Aktinmenge standardisiert.

Reaktionsansatz:

- | | |
|--|-----------------|
| • 2 x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix | 6,25 μ l |
| • Primermix (2,5 μ M, final 0,3 μ M) | 1,5 μ l |
| • cDNA 1:24 verdünnt | 2 μ l |
| • Bidest | ad 12,5 μ l |

Thermocyclerbedingungen:

95°C	15:00 min	
94°C	00:15 min	} 45 x
x°C	00:30 min	
72°C	00:30 min	

+ Schmelzkurvenanalyse 65°C-95°C

x = Primerspezifische Temperatur, siehe Anhang

3.2.11.3 Kopiezahlberechnung und Auswertung der Daten

$(X \text{ g}/\mu\text{l DNA} / (\text{Plasmidlänge in nt} \times 660)) \times 6,023 \times 10^{23} = Y \text{ Moleküle}/\mu\text{l}$

1 μ g genomische DNA = $3,4 \times 10^5$ Kopien eines single copy Gens

1 μ g DNA (1000 nt) = $9,1 \times 10^{11}$ Moleküle

Die Untersuchungen der Proben wurde im Dreifachansatz für jede Probe in der real-time RT-PCR durchgeführt und der Mittelwert errechnet. Die Abweichung der drei Werte durfte maximal einen halben Zyklus betragen, andernfalls wurde der PCR-Lauf wiederholt. Die Mittelwerte der C_T -Werte wurden für das Zielgen und für das β -Aktin in nicht-infizierten sowie in infizierten Proben ermittelt. Alle C_T -Werte wurden auf die Expression von β -Aktin angeglichen, um von gleichen Transkriptmengen auszugehen. Zwischen nicht-infizierten und infizierten Proben wurde ein Faktor berechnet, der die Regulation der Transkription für das untersuchte Gen angab.

Beispiel:

	Aktin, C_T	ΔC_{T,Aktin}	Zielgen, C_T	ΔC_{T,Zielgen}	ΔΔC_{T,Zielgen}	2e^{ΔΔCT, Zielgen}
Kontrolle	20	0	20	20	0	1
Infiziert	21	-1	19	18	2	4

Für das β-Aktin wurde die Differenz der C_T-Werte zwischen PCV-infizierter und nicht-infizierter Probe berechnet (ΔC_{T,Aktin}), um von gleichen mRNA-Mengen als Basistranskription auszugehen:

$$\Delta C_{T,Aktin} = C_T \text{ nicht-infiziert } (\beta\text{-Aktin}) - C_T \text{ infiziert } (\beta\text{-Aktin})$$

Diese Abweichung der Transkriptkonzentration innerhalb des Standardgens β-Aktin zwischen der infizierten und nicht-infizierten Probe wurde auf das C_T des Zielgens übertragen:

$$\Delta C_{T,Zielgen} = C_T (\text{Zielgen}) + \Delta C_{T,Aktin}$$

Da die β-Aktin-Werte nun angeglichen waren, konnte die C_T-Werte des Zielgens zwischen der infizierten und der nicht-infizierten Probe verglichen und auf eine Differenz untersucht werden:

$$\Delta\Delta C_{T,Zielgen} = \Delta C_{T,Zielgen} \text{ nicht-infiziert} - \Delta C_{T,Zielgen} \text{ infiziert}$$

Da sich die Produkte in einer optimalen Reaktion verdoppeln, die Reaktion also exponentiell verläuft, berechnen sich die Unterschiede der Genexpression wie folgt:

$$\text{Faktor: } 2 \times e^{\Delta\Delta C_{T,Zielgen}}$$

Da auf die nicht-infizierten Proben standardisiert und damit verglichen wurde, ergab sich ein ΔΔC_{T,Zielgen} der PCV-freien Proben von 0, somit 2 x e⁰ = 1. Alle Werte der nicht-infizierten Kontrolle entsprachen also 100%. Abweichungen der Transkriptmenge in PCV-infizierten Proben ergaben bei einer Erhöhung der Transkription des Zielgens Werte > 100% (>1), bei einer Erniedrigung waren die Werte kleiner. Ein Gen, dessen Transkriptionsrate sich durch Infektion z.B. vervierfachte, besaß im Vergleich zur Kontrolle einen um 2 kleineren C_T-Wert. Also ist ΔΔC_{T,Zielgen} = 2, dies entspricht einem Faktor von 4 nach 2 x e^{ΔΔCT, Zielgen}. Werte größer als 1,8 bzw. Werte kleiner als 0,6 wurden als Regulationsphänomene bewertet.

3.2.12 Durchflusszytometrische Analyse

Die Expression z.B. des MHC Klasse I-Antigens wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die an der Oberfläche der Zelle präsentierten Moleküle wurden mittels Farbstoffgekoppelter MHC I-spezifischer Antikörper nach Zellgröße, Granularität und Fluoreszenzintensität nach Laseraktivierung eingeteilt.

Oberflächenproteindetektion

Die Untersuchung an jeweils 5×10^5 Zellen fand mit Hilfe spezifischer Antikörper statt. Fluoreszenzfarbstoff-markierte Zweitantikörper wurden zur Erkennung der Erstantikörper eingesetzt. Die Waschschriffe zwischen den Markierungsschritten wurden mit 150 μ l FACS-PBS (1% FKS in PBS) durchgeführt. Zentrifugationsschritte während des gesamten Ablaufs erfolgten für 5 min bei 550 g und 4°C (Eppendorf 5415C). Durch Zugabe von 50 μ l eines FACS-PBS-Waschpuffers, der Pferdeimmenserum enthielt, konnten unspezifische Immunglobulinbindungsstellen blockiert werden (20 Min Inkubation auf Eis). Nach Zentrifugation und einem Waschschriff wurden die Zellen in 50 μ l unmarkiertem Erstantikörper verdünnt in FACS-PBS für 30-45 Minuten auf Eis inkubiert. Nach zwei Waschschriffen erfolgte die Zugabe der FITC oder PE-markierten, in FACS-PBS verdünnten Zweitantikörper (50 μ l) für 30 Minuten auf Eis. Drei Waschschriffe mit dem FACS-PBS-Waschpuffer sowie Zentrifugationen für 5 min bei 550 g und 4°C schlossen sich an. Zur Auswertung wurde das Zellpellet in 100 μ l FACS-PBS, 1 x Cellfix oder alternativ in 1 x Cytotfix-Cytoperm™-Lösung (BD Biosciences) aufgenommen.

Zur Anwendung kamen unmarkierte Maus-Antikörper gegen das porcine Oberflächenantigen MHC I (74-11-01). Als Zweitantikörper diente ein Ziege-anti-Maus-Antikörper der mit FITC (1:200 in FACS-PBS) oder PE (1:50 in FACS-PBS) gekoppelt war.

Bei der Probenauswertung kam ein Durchflusszytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson) zum Einsatz. Dieses ist in der Lage, mittels Laserlichtdetektion im Vorwärts (forward scatter)- und Seitwärtsstreulicht (side scatter) die Zellpopulation anhand der Zellgröße (Vorwärtslaser) und Granularität (90° versetzter Seitwärtslaser) auszuwerten. Je nach Fluoreszenzspektrum des gewählten Zweitantikörpers können Farbkanäle zugeschaltet werden, die spezifisch die emittierte Lichtlänge erkennen. Mit Hilfe der verschiedenen Parameter können Größe und Granularität sowie Fluoreszenzintensität bestimmt werden. Die analysierte Zellzahl beträgt 1×10^5 Ereignisse pro Ansatz. Zur Skalierung der Messgrößen auf die unterschiedlichen Zelltypen bedarf es unbehandelter Zellen. Als weitere Kontrolle ist die unspezifische Bindung des Zweitantikörpers zu überprüfen. Zu diesem Zweck wurden Zellen nur mit diesem Antikörper inkubiert.

Detektion viraler Fusionsproteine

Zellkulturzellen wurden mit Expressionsplasmiden für Virusproteine transfiziert, in denen PCV-Proteine mit Fluoreszenzproteinen fusioniert vorlagen. Diese können mit Laserlicht angeregt werden. In den Vektor pDsRed1N1 klonierte Sequenzen kodierend für die PCV1 Proteine Rep (pDsRedREP), Rep' (pDsRedREP') und Cap (pDsRedCAP) wurden so in Zellen eingebracht und in Studien über differentielle Expression des MHC I-Antigens mittels Durchflusszytometrie oder Immunfluoreszenz ausgewertet.

Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse

Das Programm CellQuest 3.3 (Becton Dickinson) analysierte die am Durchflusszytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson) vorgenommenen Messungen. Hierbei war es möglich einzelne Zellpopulationen im Hinblick auf das Vorhandensein von fluoreszenzgebundenen Antikörper zu untersuchen, indem spezifische Gates um ausgewählte Zellen gelegt wurden. In Histogrammen oder Dotblots konnte die Menge und Intensität der fluoreszenzmarkierten Antikörper dargestellt werden. Zwei Farbstoffe ließen sich getrennt voneinander auswerten. Alle Versuche wurden in Doppelansätzen mindestens zweimal durchgeführt. Nach Mittelwertberechnungen wurden die Differenzen der Fluoreszenz der einzelnen Versuchsanordnungen erhalten.

3.2.13 Immunfluoreszenz

Zellen aus Präparationen für die Durchflusszytometrie wurden auf Objektträger ausgestrichen und luftgetrocknet. Die Fixierung erfolgte mit DAKO®-Einbettungsmedium und einem Deckgläschen. Am Fluoreszenzmikroskop Axiovert 2000 (Zeiss Vision, München) wurde die Auswertung und Fotodokumentation vorgenommen.

3.2.14 Sequenzierung

Bei der Sequenzierung nach der Didesoxy-Methode nach Sanger (Sanger et al., 1977) wird ein Kettenabbruch gezielt herbeigeführt, um die Nukleotidabfolge in einer Sequenz zu bestimmen. Hierbei wird in einer PCR-ähnlichen Reaktion zu der unbekanntem Ausgangssequenz ein Prämix aus dNTPs, Fluoreszenz-markierten ddNTPs, einem Primer, Puffer und DNA-Polymerase gegeben. Die Annealingtemperatur richtet sich nach dem eingesetzten Primer. Eine Kopie der Ausgangssequenz entsteht, die nach Einbau eines ddNTPs nicht weiter verlängert werden kann, da die hierfür benötigte 3'-OH Gruppe fehlt. Die Synthese bricht demzufolge ab und Fragmente unterschiedlicher Länge entstehen. Die DNA wird der Größe nach in einem 4,8%igen, denaturierenden Polyacrylamidgel separiert.

Die fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente werden durch einen Argonlaser angeregt, die emittierte Farbwellenlänge nach Fokussierung über einen Hohlspiegel prismatisch über eine CCD-Optik detektiert und mittels ABI PRISM DNA Sequencing Analysis Software (Version 3.7) ausgewertet.

Sequenzierungsansatz:

- | | |
|-----------------------------------|------------------|
| • Primer (10 μ M) | 0,5-1 μ l |
| • Prämix (Big Dye) | 1,5-3 μ l |
| • DNA (VektorDNA: ad 500-1000 ng) | x μ l |
| • Bidest | ad 10/20 μ l |

Thermocyclerbedingungen:

95°C 2 min 30 sek

96°C 10 sek	} 25x
X°C 5 sek	
60°C 4 min	

(X = Primerspezifische Annealingtemperatur, siehe Anhang)

3.2.15 Sequenzdatenaufbereitung

Die Rohdaten wurden durch Bearbeitung mit dem Programm Factura (Applied Biosystems) bearbeitet. Eine Überprüfung der angezeigten Nukleotidabfolge schloss sich an. Erhaltene Sequenzen wurden in eine Datei des Programmes MacVector 7.0 (Symantec Corp.) umgewandelt und mit bekannten Sequenzen der NCBI-Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.org) verglichen, auf Nukleotidebene mittels der BLAST N bzw. auf Proteinebene mittels BLAST X analysiert.