

Bernburg  
Dessau  
Köthen



**Hochschule Anhalt (FH)**  
Anhalt University of Applied Sciences

**Nachweis porziner Antikörper gegen  
das Rotavirus-Enterotoxin NSP4**

**Bachelorarbeit**

**Zur Erlangung des akademischen Grades**

**Bachelor of Science (B.Sc.)**

**Eric Engel**

**Mat. Nr.:** 4056616

**Studiengang:** Biotechnologie (BT)

**1. Gutachter:** Herr Prof. Dr. Junghannß

**2. Gutachter:** Herr Prof. Dr. Heun

**Datum der Abgabe:** 25.06.2018

## Inhaltsverzeichnis

|   |     |
|---|-----|
| Inhaltsverzeichnis .....                        | I   |
| I. Abkürzungsverzeichnis .....                  | II  |
| II. Abbildungsverzeichnis .....                 | III |
| III. Tabellenverzeichnis .....                  | IV  |
| 1 Einleitung .....                              | 1   |
| 1.1 Das Rotavirus .....                         | 1   |
| 1.1.1 Bedeutung .....                           | 1   |
| 1.1.2 Morphologie und Genomaufbau .....         | 2   |
| 1.1.3 Struktur- und Nichtstrukturproteine ..... | 4   |
| 1.2 Virales Enterotoxin NSP4 .....              | 5   |
| 1.3 Rotaviren beim Schwein .....                | 6   |
| 1.4 Zielstellung .....                          | 7   |
| 2 Material .....                                | 9   |
| 2.1 Antikörper .....                            | 9   |
| 2.2 Bakterienstamm .....                        | 9   |
| 2.3 Chemikalien .....                           | 10  |
| 2.4 Geräte .....                                | 10  |
| 2.5 Größenstandard .....                        | 12  |
| 2.6 Kulturmedien .....                          | 12  |
| 2.7 Oligonukleotide .....                       | 13  |
| 2.8 Probenmaterial .....                        | 14  |
| 2.9 Reaktionssysteme .....                      | 15  |
| 2.10 Vektorsystem .....                         | 17  |
| 2.11 Verbrauchsmaterialien .....                | 18  |
| 2.12 Virusstämme .....                          | 18  |
| 2.13 Zelllinien .....                           | 19  |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 3     | Methoden.....   | 20 |
| 3.1   | Molekulare Klonierung.....  | 20 |
| 3.1.1 | RNA-Isolation .....   | 20 |
| 3.1.2 | Reverse Transkription .....   | 21 |
| 3.1.3 | PCR zur Gewinnung von DNA-Inserts .....                                   | 22 |
| 3.1.4 | Ligation .....  | 23 |
| 3.1.5 | Agarose-Gelelektrophorese zu Visualisierung von DNA .....                 | 23 |
| 3.1.6 | DNA-Sequenzierung .....   | 24 |
| 3.1.7 | Isolierung von PCR-Fragmenten.....  | 25 |
| 3.2   | Prokaryotische Zellkultur .....   | 25 |
| 3.2.1 | Transformation von chemisch kompetenten Bakterien.....                    | 25 |
| 3.2.2 | Kolonie-PCR .....   | 26 |
| 3.2.3 | Plasmidpräparation.....   | 27 |
| 3.3   | Synthese von mRNA .....   | 28 |
| 3.3.1 | PCR zur Gewinnung von DNA-Inserts zur <i>in vitro</i> Transkription ..... | 28 |
| 3.3.2 | <i>In vitro</i> Transkription .....                                       | 30 |
| 3.3.3 | Agarose-Gelelektrophorese zur Visualisierung von RNA.....                 | 31 |
| 3.4   | Eukaryotische Zellkultur .....  | 31 |
| 3.4.1 | Kultivierung .....  | 31 |
| 3.4.2 | Passagieren .....   | 31 |
| 3.4.3 | Zellzählung.....  | 32 |
| 3.4.4 | Mykoplasmentest .....   | 32 |
| 3.4.5 | Infektion mit porzinen Rotaviren .....                                    | 33 |
| 3.4.6 | Transfektion .....  | 34 |
| 3.4.7 | Indirekter Immunfluoreszenz-Test.....                                     | 36 |
| 4     | Ergebnisse .....  | 37 |
| 4.1   | Generierung rekombinanter Plasmid-DNA .....                               | 37 |
| 4.1.1 | Gewinnung von PCR-Fragmenten .....  | 37 |

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 4.1.2  | Nachweis der Insertion mittels Kolonie-PCR .....                                  | 39 |
| 4.2    | DNA-Sequenzierungen.....  | 40 |
| 4.2.1  | Sequenzabgleich mit bekannten Rotavirusstämmen .....                              | 41 |
| 4.2.2  | Bestimmung potentieller NSP4-Epitope .....  | 42 |
| 4.3    | Synthese artifizierter Rotavirus-mRNAs mittels <i>in vitro</i> Transkription..... | 44 |
| 4.4    | Etablierung der Zellkultursysteme.....  | 45 |
| 4.4.1  | Mykoplasmentest .....   | 45 |
| 4.4.2  | Bestimmung optimaler Zellzahlen .....   | 46 |
| 4.4.3  | Optimierung der Transfektionsbedingungen.....                                     | 48 |
| 4.5    | Funktionalität der Rotavirus-mRNAs und Nachweis der Proteinexpression .....       | 49 |
| 4.6    | Serologische Untersuchung von porzinem Probenmaterial.....                        | 51 |
| 4.6.1  | Nachweis von Antikörpern gegen Rotaviren der Gruppe A und C.....                  | 51 |
| 4.6.2  | Nachweis spezifischer Antikörper gegen das Nichtstrukturprotein 4.....            | 54 |
| 5      | Diskussion .....  | 56 |
| 5.1    | Etablierung eines geeigneten Zellkultursystems .....                              | 56 |
| 5.2    | Generierung von rekombinanten Nukleinsäuren.....                                  | 58 |
| 5.3    | Nachweis spezifischer porziner Antikörper .....                                   | 60 |
| 5.3.1  | Unter Verwendung infizierter Zellkulturen.....                                    | 60 |
| 5.3.2  | Nach Transfektion von NSP4-mRNA.....  | 62 |
| 5.4    | Zusammenfassung / Ausblick.....   | 64 |
| IV.    | Literaturverzeichnis.....   | V  |
| Anhang | .....   | VI |

# I. Abkürzungsverzeichnis

## Symbole und Formelzeichen

| Symbol         | Einheit            | Bedeutung             |
|----------------|--------------------|-----------------------|
| GC-Gehalt      | %                  | Guanin-Cytosin-Gehalt |
| t              | sek                | Zeit                  |
| T              | °C                 | Temperatur            |
| T <sub>M</sub> | °C                 | Schmelztemperatur     |
| g              | m / s <sup>2</sup> | Erdbeschleunigung     |

## Abkürzungen

| Symbol | Bedeutung                                 |
|--------|---|
| Amp    | Ampicillin                                |
| ATP    | Adenosintriphosphat                       |
| BD     | Bindungsdomäne                            |
| bp     | Basenpaare                                |
| BSA    | Bovine Serum Albumin                      |
| bspw.  | beispielsweise                            |
| bzw.   | beziehungsweise                           |
| cDNA   | komplementäre Desoxyribonukleinsäure      |
| CPE    | zytopathischer Effekt                     |
| CTP    | Cytidintriphosphat                        |
| d.h.   | das heißt                                 |
| DAPI   | Diamidinophenylindole                     |
| DEPC   | Diethylpyrocarbonat                       |
| DLP    | <i>double-layered particle</i>            |
| DMEM   | <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> |
| DMSO   | Dimethylsulfoxid                          |
| DNA    | Desoxyribonukleinsäure                    |
| dsRNA  | Doppelstrang Ribonukleinsäure             |
| DTT    | Dithiothreitol                            |
| EDTA   | Ethylendiamintetraessigsäure              |

|       |  |
|-------|--|
| ELISA | <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>             |
| ER    | endoplasmatisches Retikulum                          |
| FKS   | fetales Kälberserum                                  |
| FACS  | <i>fluorescence-activated cell scanning</i>          |
| g     | Gramm  |
| GFP   | <i>Green Fluorescent Protein</i>                     |
| GTP   | Guanosintriphosphat                                  |
| h     | Stunde   |
| IFA   | Immunfluoreszenz-Test                                |
| LB    | Luria-Bertani-Broth                                  |
| M     | Größenstandard                                       |
| MCS   | Multiple cloning site                                |
| mg    | Milligramm   |
| Mio.  | Millionen  |
| ml    | Milliliter   |
| mM    | Millimol   |
| NCBI  | <i>National Center for Biotechnology Information</i> |
| ng    | Nanogramm  |
| NK    | Negativkontrolle                                     |
| nm    | Nanometer  |
| NSP   | Nichtstrukturprotein                                 |
| nt    | Nukleotide   |
| ORF   | <i>Open Reading Frame</i>                            |
| PABP  | Poly(A)-bindendes Protein                            |
| PBS   | Phosphatgepufferte Kochsalzlösung                    |
| PCR   | Polymerase Kettenreaktion                            |
| PFA   | Paraformaldehyd                                      |
| pMol  | Pikomol  |
| RdRp  | RNA-abhängige RNA-Polymerase                         |
| rep   | Replicon   |
| RNA   | Ribonukleinsäure                                     |
| rpm   | <i>revolutions per minute</i>                        |
| RVA   | Rotaviren der Gruppe A                               |
| RVB   | Rotaviren der Gruppe B                               |

|       |                                |
|-------|--------------------------------|
| RVC   | Rotaviren der Gruppe C         |
| RV    | Rotavirus                      |
| siRNA | <i>small interfering RNA</i>   |
| SLP   | <i>single-layered particle</i> |
| SOC   | <i>super optimal catabolic</i> |
| ssRNA | <i>single-stranded RNA</i>     |
| ST    | <i>swine testicular</i>        |
| TLP   | <i>triple-layered particle</i> |
| UTP   | Uridintriphosphat              |
| UTR   | <i>untranslated regions</i>    |
| VP    | virales Protein                |
| µg    | Mikrogramm                     |
| µl    | Mikroliter                     |
| µm    | Mikrometer                     |

## II. Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| <b>Abbildung 1:</b> Struktur des Rotavirus-Partikels.....  | 3  |
| <b>Abbildung 2:</b> Schematische Darstellung der Proteindomänen von NSP4.....  | 5  |
| <b>Abbildung 3:</b> RT-PCR-Produkte des für das NSP4 kodierende Gensegments<br>10 der porcinen Rotavirusstämme OSU und AMC-1. .... | 38 |
| <b>Abbildung 4:</b> Nachweis der Insertion des für NSP4 kodierenden Gensegments<br>von RVA mittels Kolonie-PCR.....                | 39 |
| <b>Abbildung 5:</b> Nachweis der Insertion von RVC mittels Kolonie-PCR.....  | 40 |
| <b>Abbildung 6:</b> Phylogenetischer Baum für das Gensegment 10 bekannter<br>Rotavirusstämme. ....                                 | 41 |
| <b>Abbildung 7:</b> Schematische Darstellung potentieller NSP4-Epitope. ....   | 43 |
| <b>Abbildung 8:</b> Agarose-Gelelektrophorese der mittels <i>in vitro</i> Transkription<br>gewonnenen mRNA. ....                   | 44 |
| <b>Abbildung 9:</b> Gegenüberstellung eines negativen und positiven<br>Mykoplasmentests im Fluoreszenzmikroskop. ....              | 45 |
| <b>Abbildung 10:</b> Optimale Zellzahlen der Zelllinien BSR-T7, MA-104 und ST.....   | 47 |
| <b>Abbildung 11:</b> Transfektion von BSR-T7-Zellen mittels des Plasmids pTIT-GFP. ....  | 49 |
| <b>Abbildung 12:</b> Nachweis der Funktionalität von transfizierter NSP4-mRNA.....   | 50 |
| <b>Abbildung 13:</b> Nachweis von Antikörpern gegen RVA in porcinen Milchproben.....   | 52 |
| <b>Abbildung 14:</b> Nachweis von Antikörpern gegen RVC in porcinen Milchproben. ....  | 53 |
| <b>Abbildung 15:</b> Nachweis spezifischer Antikörper gegen RVA-NSP4.....  | 55 |
| <b>Abbildung 16:</b> Bandenprofil des GeneRuler™ DNA Ladder Mix. ....  | VI |
| <b>Abbildung 17:</b> Verwendeter pJET1.2/Blunt-Vektor zur Klonierung von DNA-<br>Fragmenten.....                                   | VI |



### III. Tabellenverzeichnis

|                    |   |    |
|--------------------|---|----|
| <b>Tabelle 1:</b>  | Verwendete Antikörper für den indirekten Immunfluoreszenz-Test.....         | 9  |
| <b>Tabelle 2:</b>  | Verwendete Chemikalien.....   | 10 |
| <b>Tabelle 3:</b>  | Verwendete Geräte.....  | 11 |
| <b>Tabelle 4:</b>  | Komponenten zur Herstellung des LB-Mediums. ....                            | 12 |
| <b>Tabelle 5:</b>  | Komponenten zur Herstellung des SOC-Mediums.....                            | 13 |
| <b>Tabelle 6:</b>  | Verwendete Primer. ....   | 13 |
| <b>Tabelle 7:</b>  | Im Rahmen der Studie verwendetes Probenmaterial. ....                       | 15 |
| <b>Tabelle 8:</b>  | Verwendete Verbrauchsmaterialien.....                                       | 18 |
| <b>Tabelle 9:</b>  | Verwendeten Virusstämme.....  | 18 |
| <b>Tabelle 10:</b> | Programm für die PCR.....   | 22 |
| <b>Tabelle 11:</b> | Thermalprogramm für die Kolonie-PCR.....                                    | 27 |
| <b>Tabelle 12:</b> | Programm der PCR.....   | 29 |
| <b>Tabelle 13:</b> | Immunogenität der Rotavirusstämme OSU und AMC-1.....                        | 43 |
| <b>Tabelle 14:</b> | Standardprotokoll der Transfektionssysteme im 96-Kavitätenformat.....       | 48 |
| <b>Tabelle 15:</b> | Elemente und deren Funktion sowie Position im Plasmid<br>pJET1.2/blunt..... | VI |

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Rotavirus

Infektionen mit Rotaviren stellen eine Hauptursache für Gastroenteritiden bei Kleinkindern unter fünf Jahren dar. Die viralen Partikel verursachen vor allem bei Säuglingen und Kleinkindern (Desselberger, 2014; Vlasova et al., 2017) eine zum Teil lebensbedrohliche, stark wässrige Diarrhoe (Bishop et al., 1973). Aufgrund ihres hohen zoonotischen Potentials und der weltweiten Verbreitung sind Rotaviren darüber hinaus auch in der Veterinärmedizin von großer Bedeutung. Taxonomisch werden Rotaviren, welche ihren Namen durch die rad-ähnliche Erscheinung des Virion erhielten (Flewett et al., 1974), in die Familie der *Reoviridae* sowie der Unterfamilie *Sedoreovirinae* eingeordnet (Desselberger, 2014; Matthews, 1979).

### 1.1.1 Bedeutung

Zurzeit werden serologisch zehn verschiedene Rotavirus-Gruppen A bis J unterschieden, wobei es sich bei den Gruppen I und J um tentative Gruppen handelt (Alekseev et al., 2018; Vlasova et al., 2017). Hierbei ist das Wirtsspektrum breit gefächert. Das Virus konnte sowohl beim Menschen, als auch aus einer Vielzahl verschiedener Tierarten isoliert werden. Für Mensch und Tier sind hierbei die Gruppen A, B und C von größerer Bedeutung, wobei die häufigsten Krankheitsfälle bei Mensch und Tier überwiegend durch Rotaviren der Gruppe A ausgelöst werden. Die Gruppen A, B, C, E, H, I und J wurden in verschiedenen Säugern (z.B. Rindern, Schweinen, Pferden, Hunden, etc.) entdeckt, wohingegen es sich bei den Gruppen D, F und G um ausschließlich tierpathogene Viren handelt, welche in Geflügel, wie Hühnchen und Truthahn, nachgewiesen wurden (Beards, 2017; Vlasova et al., 2017). Die tierpathogenen Rotaviren sind insbesondere in der Schweine- und Rinderhaltung von hoher Relevanz, da es bei einer Infektion vor allem bei den Jungtieren zu einem verminderten Wachstum und einer geringen Gewichtszunahme kommt. Die humanen Rotaviren sind in der Lage, schwere Durchfallerkrankungen zu verursachen, die vor allem für Kleinkinder eine große Gefahr darstellen. Die ersten Symptome sind nach einer Inkubationszeit von 1 bis 3 Tagen zu vernehmen (Dennehy, 2000). Diese treten vor allem in Form von Übelkeit, Erbrechen, wässrigem Durchfall und Fieber auf (Beards, 2017). Bleibt nach der Infektion eine Behandlung aus, kommt es zu hohen Flüssigkeits- und Elektrolytverlusten. Dies ist vor allem in Entwicklungsländern eine ernstzunehmendes Problem, da hier die medizinische Versorgung schlecht ist und die hygienischen Verhältnisse große Mängel aufweisen. Die

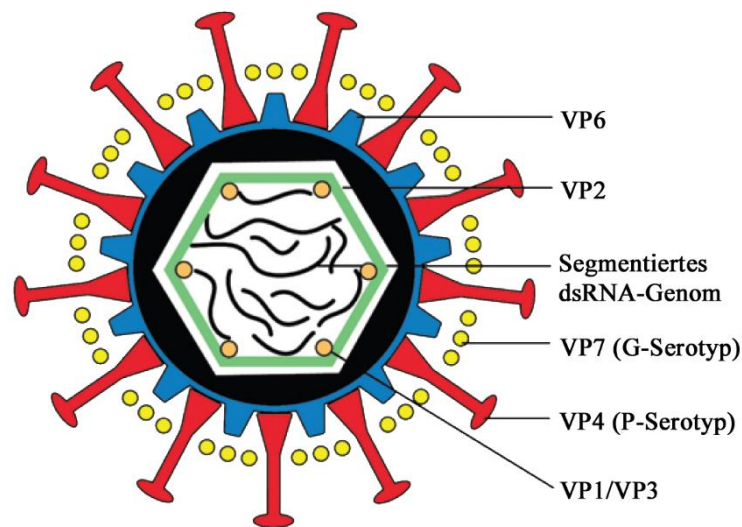
Einführung zweier Vakzinen im Jahre 2006 (Buttery et al., 2011) senkten die Anzahl der Todesfälle, jedoch führt eine Rotavirus-Infektion trotz allem nach wie vor nicht selten zum Tod. Dies zeichnet sich durch eine jährliche Erkrankung weltweit von über 110 Mio. Kleinkinder im Alter bis zu fünf Jahren aus. Die Anzahl der durchschnittlichen Todesfälle liegt bei ca. 215.000 pro Jahr (Parashar et al., 2003; Parashar et al., 2006; Tate et al., 2016).

Die Übertragung des Rotavirus erfolgt über den fäkal-oralen Weg direkt von Mensch zu Mensch (Dennehy, 2000). Im Kot einer infizierten Person können mehr als 10 Billionen infektiöse Partikel pro Gramm enthalten sein, wobei weniger als 100 Partikel für eine weitere Ansteckung ausreichend sind (Grimwood & Lambert, 2009). Eine indirekte Übertragung ist durch den Kontakt mit kontaminierten Händen, Oberflächen und Gegenständen (Beards, 2017; Surendran, 2008), verunreinigtem Wasser und Lebensmitteln möglich. Darüber hinaus wird eine Verbreitung durch die Atemwege vermutet (Dennehy, 2000). Die Erreger besitzen eine hohe Tenazität was ihnen ein Überleben von 9 bis 19 Tage unter verschiedensten Umwelteinflüssen ermöglicht und die Verbreitung sehr begünstigt. (Rao et al., 1984).

### 1.1.2 Morphologie und Genomaufbau

Die unbehüllten Rotaviren besitzen komplexe Viruspartikel, welche mit den *spikes* etwa 100 nm groß sind und eine ikosaedrische, konzentrische Symmetrie aufweisen. Die Struktur und Anordnung der einzelnen Bestandteile konnten hierbei mittels Kryoelektronenmikroskopie und Röntgenkristallographie ausgemacht werden (Hu et al., 2012; Ruiz et al., 2009). Das Kapsid des Partikels wird von drei Proteinschichten gebildet. Diese werden in äußere, mittlere und innere Schale unterteilt (Beards, 2017; Desselberger, 2014). Die vollständigen infektiösen Partikel werden in dieser Form auch als *triple-layered particle* (TLP) bezeichnet. Die *single-layered particles* (SLP), bei denen es sich um Partikel gebildet aus der inneren der drei Proteinschichten handelt, besteht aus 120 Molekülen des viralen Proteins (VP) 2. Die Kernhülle umschließt das virale Genom von 11 Segmenten der doppelsträngigen RNA (dsRNA) und ist assoziiert mit den Strukturproteinen VP1, der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRp), und VP3 (Desselberger, 2014). Die mittlere Proteinschicht wird von 260 Trimeren des viralen Proteins VP6 (Mathieu et al., 2001) gebildet, so dass *double-layered particles* (DLPs) entstehen. Diese sind wie auch die SLPs noch nicht infektiös, jedoch bereits von großer Bedeutung für den Lebenszyklus der Viren. Weiterhin interagieren die VP6-Trimere mit den 260 VP7-Trimeren auf der äußeren Schicht und den etwa 60 Proteinvorsprüngen der VP4-Trimere (Charpilienne et al., 2002). Diese bilden zusammen die

TLPs, welche für die Ausbildung der Infektiosität der Viren verantwortlich sind (Estes et al., 1981). In der Abbildung 1 ist die Struktur der Rotavirus-Partikel veranschaulicht dargestellt.



**Abbildung 1:** Struktur des Rotavirus-Partikels. Die etwa 100 nm großen Rotavirus-Partikel werden von sechs Strukturproteinen gebildet und weisen eine ikosaedrische, konzentrische Symmetrie auf. Da es sich um ein unbehülltes Virus handelt, wird das segmentierte Genom nur von einem dreischichtigem Kapsid umgeben (modifiziert nach Grimwood & Lambert, 2009).

Das Genom der Rotaviren besteht aus 11 einzigartigen dsRNAs, welche eine Gesamtlänge von 18000 bis 19000 Basenpaaren (bp) aufweisen und segmentiert vorliegen (Beards, 2017; Desselberger, 2014). Die dsRNA-Segmente werden von 1 bis 11 nummeriert und kodieren jeweils nach abnehmender Größe für ein Protein, mit Ausnahme von Segment 11, welches in einigen Rotavirusstämmen bicistronisch ist und über einen zweiten offenen Leserahmen (ORF) verfügt (Beard, 2017; Desselberger, 2014; Hu et al., 2012).

Die 11 RNA-Segmente besitzen sehr kurze, stark konservierte 5'- und 3'-terminale Nukleotidsequenzen. Charakteristisch ist für das 5'-Ende die Sequenz „GGC“, wobei das 3'-Ende die Sequenz „ACC“ aufweist. Am 5'-Terminus des Plusstranges befindet sich eine 5'-methylierte *Cap* 1-Struktur ( $m^7GpppGm$ ), welche die Stabilität sowie die Effizienz der Translation erhöht. Da die Polyadenylierung am 3'-Terminus fehlt, weisen Rotavirus-mRNAs hier eine Konsensus-Sequenz mit dem Motiv UGUGACC auf (Patton, 2004; Tortorici et al., 2006). Dieses fungiert als RdRp-Erkennungssignal (Tortorici et al., 2003) und interagiert mit dem NSP3, welches an der Aktivierung der Translation beteiligt ist (Desselberger, 2014).

### 1.1.3 Struktur- und Nichtstrukturproteine

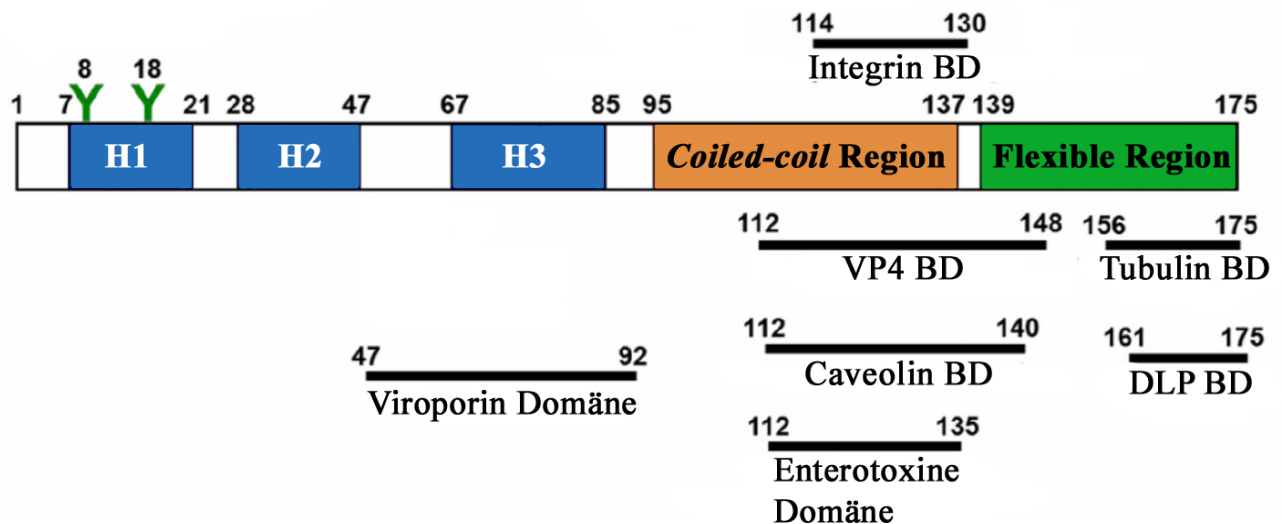
Das dsRNA-Genom der Rotaviren kodiert für sechs Struktur- (VPs) und sechs Nichtstrukturproteine (NSPs) (Desselberger & Huppertz, 2011). Während die Strukturproteine VP2, VP4, VP6 und VP7 überwiegend an der Bildung der Virionen beteiligt sind, fungiert VP1 als RNA-abhängige RNA-Polymerase. Dessen Aufgabe ist die Produktion von mRNA Transkripten für die Synthese viraler Proteine sowie die Produktion identischer Kopien der Rotavirus-Segmente für die Bildung neuer Viruspartikel in infizierten Zellen (Vásquez-del Carpio et al., 2006a). Die Polymeraseaktivität von VP1, ob als Replikase oder Transkriptase, ist von dem Kernhüllenprotein VP2 abhängig. Die entstandenen Transkripte werden durch die Methyl- und Guanyltransferase VP3 in der posttranskriptionellen Modifikation mit einer 5'-Cap 1-Struktur versehen. Das *Capping* schützt die virale mRNA vor dem Abbau durch zelluläre Nukleasen und dient somit als Stabilisator der mRNAs (Beards, 2017; Cowling, 2010). Damit die Wirtszelle infiziert werden kann, muss es zu einer Anheftung des Virion an die zu infizierende Zelle kommen. Dies ermöglichen die Proteinvorsprünge VP4. Diese sogenannten *spikes* interagieren mit den salinsäurehaltigen Rezeptoren auf der zellulären Glykanschicht (Beards, 2017; Desselberger 2014). Vor der Infektiosität des Virion kommt es zu einer Veränderung des VP4 durch die im Dünndarm befindlichen Proteasen (Beards, 2017). Diese proteolytische Spaltung des Oberflächenproteins VP4 führt schließlich zur Bildung der Produkte VP5\* und VP8\*. Letzteres dient vor allem der Bindung an die Salinsäure (Dormitzer et al., 2002).

Neben den Strukturproteinen kodiert das virale Genom auch für sechs Nichtstrukturproteine, denen während der Infektion regulatorische Funktionen zukommen. Hierbei sind insbesondere NSP2 und NSP5 von Bedeutung, da diese an der Bildung sogenannter Viroplasmen beteiligt sind (Fabbretti et al., 1999). In diesen Strukturen findet die Genom-Synthese und Zusammensetzung neuer Viruspartikel statt (Patton *et al.* 2006, Petrie *et al.* 1982). Neben NSP2 und NSP5 ist auch NSP3 hoch relevant für den viralen Lebenszyklus. Da zur Translation der rotaviralen mRNA-Transkripte die wirtsspezifische Proteinbiosynthese verändert werden muss, wirkt NSP3 als Antagonist des Poly(A)-bindenden Proteins, so dass virale mRNAs bevorzugt translatiert werden (Desselberger, 2014). Während über die bisher erwähnten Nichtstrukturproteine vergleichsweise viel bekannt ist, fehlen Einblicke in die Funktion von NSP1. Bis heute ist lediglich bekannt, dass es die Interferonantwort der Wirtszellen beeinflusst und vermutlich signifikant blockiert (Beards, 2017; Desselberger, 2014). Im Gegensatz dazu, wurde exzessive Grundlagenforschung für das virale

Nichtstrukturprotein NSP4 betrieben, dem als Enterotoxin eine besondere Funktion zuzuschreiben ist und dessen Eigenschaften im folgenden Kapitel zusammengefasst sind.

## 1.2 Virales Enterotoxin NSP4

NSP4, welches durch das Gensegment 10 kodiert wird, ist ein aus 175 Aminosäuren bestehendes Protein. Es tritt entweder als Peptid-Fragment oder als Gesamtmolekül auf (Desselberger, 2014; Hu et al., 2012). Bei NSP4 handelt es sich um ein multifunktionelles Protein, dessen vielseitige Funktionen auf verschiedenen Proteindomänen beruhen (siehe Abbildung 2). NSP4 wird im endoplasmatischen Retikulum (ER) als Transmembran-Glykoprotein synthetisiert und besitzt drei hydrophobe Domänen (H1 bis H3) mit zwei N-verknüpften Mannose-Glykosylierungsstellen. Diese Glykosylierungsstellen befinden sich an der luminalen Seite des ER in der H1-Domäne (Bergmann et al., 1989). Die H2-Domäne interagiert mit der ER-Doppelschicht. Die dritte hydrophobe Domäne (H3) dient als Viroporin, welches aus positiv geladenen Resten und einer amphipathischen  $\alpha$ -Helix besteht. Anhand der H3-Domäne wird die zelluläre Calciumhomöostase durch Viroporin-vermittelter Freisetzung von intrazellulären ER-Calciumvorräten unterbrochen (Hyser et al., 2010). Dies hat eine Erhöhung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes zur Folge und damit direkten Einfluss auf die Ausbildung der klinischen Symptome, insbesondere der wässrigen Diarrhoe.



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der Proteindomänen von NSP4. Die Bindungsdomänen (BD) befinden sich hauptsächlich in der *coiled-coil*- und der flexiblen Region. Auf der hydrophoben Domäne H1 sind zusätzlich die N-verknüpften Mannose-Glykosylierungsstellen (grüne Y) dargestellt (modifiziert nach Hu et al., 2012).

Neben den hydrophoben Domänen besitzt NSP4 ebenfalls eine zytoplasmatische Domäne, welche eine *coiled-coil*-Region und einen flexiblen C-Terminus beinhaltet (Hu et al., 2012). Auf der zytoplasmatischen *coiled-coil*-Domäne konnten unter anderem Integrin-I-Domänen, Caveolin- und VP4-Bindedomänen nachgewiesen werden (Hyser et al., 2007; Parr, et al., 2005; Seo et al., 2008). Die Hauptfunktion von NSP4 in infizierten Wirten ist, die Wirkung als virales Enterotoxin. Dabei kann eine von infizierten Zellen sezernierte Form des NSP4 an die auf der basolateralen Plasmamembran lokalisierten Integrin- $\alpha 1\beta 1$ - und Integrin- $\alpha 2\beta 1$ -Rezeptoren binden und so auch nicht infizierte Darmzellen beeinflussen. Die aktivierten Integrin-Rezeptoren stimulieren auf diese Weise intrazelluläre Kettenreaktionen, die mit der Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und einer starken Diarrhoe einhergehen. Darüber hinaus kann der flexible C-Terminus von NSP4 an Mikrotubuli binden und mit VP6 als intrazellulären Rezeptor für DLPs interagieren. Dies erleichtert den Zusammenbau infektiöser Partikel und trägt damit zur raschen Verbreitung der Infektion im Wirt bei (Au et al., 1989; Taylor et al., 1996; Xu et al., 2000). Des Weiteren wurden eine Beteiligung von NSP4 an der Schwächung der Plasmamembranintegrität, bei der Inhibition der Natriumabsorption durch epitheliale Natriumkanäle und des Natriumglukosetransporters 1 sowie bei der Remodellierung von zellulären Mikrotubulus- und Aktinnetzwerken beobachtet (Hu et al., 2012). Der Einfluss von NSP4 auf die zellulären Mechanismen und damit auch auf die Homöostase des Wirtes ist demnach massiv. Eine Hemmung von NSP4 und den zugehörigen Peptiden, z.B. durch die Induktion einer neutralisierenden Immunantwort, könnte demnach entscheidend zur Linderung der Rotavirus-assoziierten Symptome bei Mensch und Tier beitragen.

### 1.3 Rotaviren beim Schwein

Nachdem die Rotaviren im Jahre 1973 das erste Mal aus Probenmaterial von australischen Kindern isoliert werden konnten, kam es zwei Jahre später in Schweinen zur Identifikation der Rotaviren. Von den zehn Rotavirus-Gruppen wurden die Gruppen A (RVA), B (RVB), C (RVC), E und H in Schweinen entdeckt (Alekseev et al., 2018; Vlasova, 2017). Seit ihrer Isolierung handelt es sich bei RVA um die am besten erforschte Gruppe der Rotaviren. Sie wurden bei Schweinen im Alter von bis zu einem Monat nachgewiesen (Vlasova, 2017). Infektionen mit RVA treten hierbei in Schweinen weltweit auf. Dabei zeigen sich nicht immer massive Anzeichen einer Klinik. Die Häufigkeitsrate, mit der RVA in Saugferkel auftritt, variiert von 3,3 bis 67,3 %, wobei eine Saisonalität nicht beobachtet werden konnte (Vlasova, 2017). RVB konnte im Gegensatz zu RVA und RVC anfangs nur in China, Indien und

Bangladesch detektiert werden. Einige Zeit später wurde herausgefunden, dass 31,8 % aller Vorfälle, die mit Diarrhoe beim Schwein in Nordamerika zu tun hatten, auf RVB zurückzuführen waren (Alekseev et al., 2018). Neben RVA konnte eine Infektion mit RVC ebenfalls weltweit beobachtet werden. Anhand der Antikörperhäufigkeit in Schweinen, die bei 58 % bis 100 % liegt, erscheint eine Infektion mit RVC als sehr verbreitet (Vlasova et al., 2017). Neuste Studien zeigen, dass die Häufigkeit von RVC bei infizierten Schweinen in den USA und Kanada bei 46 % liegt. Dabei konnte beobachtet werden, dass bei sehr jungen Tieren, im Alter von unter drei Tage, 78 % und bei jungen Tieren im Alter von vier bis 20 Jahren 65 % an RVC erkrankten und seropositiv für Antikörper waren (Marthaler et al., 2013). Lange Zeit wurde geglaubt, dass Rotaviren kein zoonotisches Potenzial besitzen und wirtsspezifisch sind. Für RVB-Stämme scheint dies zwar häufig gültig zu sein, doch beweisen die Genotypen G9 und G12 von RVA das Gegenteil. Diese wurden beim Menschen nachgewiesen, besitzen ihren Ursprung allerdings bei der porcinen Spezies (Vlasova et al., 2017). Insgesamt sind 10 G-Genotypen sowie 7 P-Genotypen porcinen Ursprungs im Menschen identifiziert worden (Vlasova et al., 2017).

Aufgrund des hohen zoonotischen Potentials sowie der Fähigkeit dieser segmentierten RNA-Viren zur Reassortierung ist es von großer Bedeutung, dass Rotavirus-Infektionen in Schweinebeständen aufmerksam kontrolliert und durch geeignete Präventionsmaßnahmen eingedämmt werden. Da es im Gegensatz zum Rind bis zum jetzigen Zeitpunkt keine lizenzierte Vakzine gegen porcine Rotaviren gibt, sollten Analysen und Studien auf diesem Gebiet höchste Priorität besitzen.

## **1.4 Zielstellung**

Rotaviren, welche zu den Hauptregern von Gastroenteritis zählen, sind in der Human- und Veterinärmedizin von besonderer Bedeutung. Die viralen Partikel verursachen vor allem bei Kleinkindern und Jungtieren verschiedener Spezies stark wässrige Diarrhoe mit teilweise schweren Verläufen. Während beim Rind überwiegend Rotaviren der Gruppe A für die Infektion ausschlaggebend sind, werden Schweine sowohl von Rotaviren der Gruppe A als auch von Viren der Gruppe C infiziert. Zum jetzigen Zeitpunkt sind kommerzielle Impfstoffe für das Rind erhältlich, für das Schwein sind jedoch noch keine Vakzine zugelassen. Die Identifizierung neuer Impfstoffkandidaten ist aber zum einen wegen des hohen zoonotischen Potentials der Rotaviren und zum anderen wegen der starken ökonomischen Verluste innerhalb der Schweinebestände dringend vonnöten.



Forschungsgruppen haben in den letzten Jahren herausgefunden, dass das Nichtstrukturprotein 4 (NSP4) als Enterotoxin wirkt und somit entscheidend für die Ausbildung der wässrigen Diarrhoe verantwortlich ist. Eine Neutralisierung des Enterotoxins durch das Immunsystem könnte aus diesem Grund vermutlich zur Verringerung der Symptome führen. Inhalt dieser Arbeit war es daher zu untersuchen, ob es bei Feldinfektionen mit porcinen Rotaviren beim Schwein zur Ausbildung eines anti-NSP 4-Antikörpertiters kommt.

Durch die Analyse von Feldmaterial, wobei Serum von Muttersäuen und jeweils zwei ihrer Ferkel sowie eine Milchprobe genutzt wurden, sollte dieser Fragestellung nachgegangen werden. Dabei wurden die zu untersuchenden Bestände so ausgewählt, dass sowohl Proben mit klinischen Symptomen in Form von wässrigem Durchfall als auch ohne vorhandene Klinik erfasst wurden.

Der erste Ansatz war herauszufinden, ob spezifische Antikörper gegen Rotaviren der Gruppen A und C im gesammelten Probenmaterial vorliegen und inwieweit eine Kreuzreaktivität zwischen beiden Gruppen nachweisbar ist. Dies erforderte die Kultivierung permissiver Zellen, welche infiziert und schließlich für den Antikörpernachweis mittels indirektem Immunfluoreszenz-Test genutzt werden konnten. Mit dem Wissen, dass sich anti-Rotavirus-Antikörper in den Feldproben befinden, sollte anschließend erfasst werden, ob diese spezifisch gegen NSP4 gerichtet sind. Zu diesem Zweck sollten zunächst artifizielle Plasmide und mRNAs, welche für das NSP4 kodieren, generiert und in Mammalia-Zellen transfiziert werden. Mittels dieser transient transfizierten Zellkulturen sollte schließlich der Detektion von NSP4-spezifischen Antikörpern im Feldmaterial unter erneuter Verwendung des Immunfluoreszenz-Tests nachgegangen werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es demnach, die Kenntnisse über die Immunantwort gegen porcine Rotavirusinfektionen zu erweitern und der Frage nachzugehen, ob es sich bei NSP4 um einen potentiellen Impfstoffkandidaten handelt.

## 2 Material

In diesem Kapitel sind alle verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien zusammengeführt, die während der gesamten Arbeit genutzt wurden. Weiterhin werden die verwendeten Mikroorganismen, Reaktionssysteme und Zelllinien aufgelistet.

### 2.1 Antikörper

Die Tabelle 1 listet alle verwendeten Antikörper auf, die in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kamen.

**Tabelle 1:** Verwendete Antikörper für den indirekten Immunfluoreszenz-Test (IFA).

| <b>Primärantikörper</b>                            | <b>Stockkonzentration</b> | <b>Lotnummer</b> | <b>Hersteller</b>                        |
|--|---------------------------|------------------|--|
| Polyklonaler anti-Rotavirus VP6<br>C (Kaninchen)   | 1370 µg / ml              | 1347-5.6         | Inhouse<br>Immunsierung                  |
| Polyklonaler anti-RVA NSP4<br>(Kaninchen)          | 28 µg / ml                | 1556-5.6         | Institut für<br>Virologie VMF<br>Leipzig |
| <b>Sekundärantikörper</b>                          | <b>Stock</b>              | <b>Lotnummer</b> | <b>Hersteller</b>                        |
| Alexa Fluor <sup>TM</sup> 488 goat anti-<br>rabbit | 2000 µg / ml              | 1885240          | ThermoFisher<br>Scientific               |
| DyLight® 488 anti-pig                              | 500 µg / ml               | GR158126-<br>1   | Abcam                                    |

### 2.2 Bakterienstamm

Für die Transformation wurden die bereits chemisch kompetenten *Escherichia coli* (*E.coli*) XL10-GOLD verwendet. Bei dem Genotyp dieser handelt es sich um endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tetR F'[proAB lacIqZΔM15 Tn10(TetR Amy CmR)]

## 2.3 Chemikalien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien können der Tabelle 2 entnommen werden.

**Tabelle 2:** Verwendete Chemikalien.

| Beschreibung                       |  | Hersteller        |
|------------------------------------|--|-------------------|
| Aceton                             |  |                   |
| Agar                               |  | Nordwald          |
| Agarose                            |  | Biozym Scientific |
| Bovines Serumalbumin               | (BSA)  | Sigma-Aldrich     |
| 4,6-Diamidino-2-phenylindol        | (DAPI, 5 mg / ml)                                  | Carl Roth         |
| Diethylpyrocarbonat                | (DEPC)   | Carl Roth         |
| Dulbecco's Modified Eagle's Medium | (DMEM, 4,5 g / l Glukose)                          | Sigma-Aldrich     |
| Dimethylsulfoxid                   | (DMSO)   | Carl Roth         |
| DPBS                               | (10x, ohne Ca <sup>+</sup> und MgCl <sub>2</sub> ) | Life Technologies |
| Dithiothreitol                     | (DTT)  | Life Technologies |
| Ethylendiamintetraessigsäure       | (EDTA)   | Serva             |
| Ethanol                            | (absolut)  | Sigma-Aldrich     |
| Ethidiumbromid                     | (EtBr, 5 mg / ml)                                  | Carl Roth         |
| Fetales Kälberserum                | (FKS)  | Sigma-Aldrich     |
| Paraformaldehyd                    | (PFA, 2 % in 1x PBS)                               | Sigma-Aldrich     |
| Tris-Essigsäure-                   | (TAE)  | Inhaus            |
| Ethylendiamintetraessigsäure       |  |                   |
| Trypanblau                         | (0,4 % in 1x PBS)                                  | Bayer             |
| Trypsin / EDTA                     | (0,5 %)  | Serva             |
| TritonX-100                        | (0,1 % in 1x PBS)                                  | Sigma-Aldrich     |
| Tween-20                           |  | Carl Roth         |

## 2.4 Geräte

Die nachfolgende Tabelle 3 listet alle Geräte auf, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

**Tabelle 3:** Verwendete Geräte.

| <b>Beschreibung</b>        | <b>Bezeichnung</b>  | <b>Hersteller</b>               |
|----------------------------|---------------------|---------------------------------|
| Analysenwaage              | PB5001              | Mettler                         |
| Autoklav                   | DX-150              | Systec                          |
| Brutschrank für Bakterien  | B40                 | Memmert                         |
| Chemiiager                 | FX-7                | Vilber Lourmat Deutschland GmbH |
| CO <sub>2</sub> -Inkubator | CB169               | Binder                          |
| Eismaschine                | -                   | Scotsman                        |
| Feinwaage                  | PM400               | Mettler                         |
| Fluoreszenzmikroskop       | IX 70               | Olympus                         |
| Gelelektrophoresekammer    | -                   | BioRad                          |
| Inverses Stereomikroskop   | CK2                 | Olympus                         |
| Kühltruhe (-80°C)          | Deep Freezer        | Nunc                            |
| Kühltruhe (-80°C)          | KM-DU53Y1E          | Panasonic                       |
| PCR-Station                | PCR Workstation Pro | PeqLab                          |
| Pipettierhilfe             | Pipettus akku       | Hirschmann                      |
| RNA-Station                | Mini-V / PCR        | Telstar                         |
| Schüttelinkubator          | Orbital Shaker 4518 | Forma Scientific                |
| Sicherheitswerkbank        | Heraafe             | Heraeus Instruments             |
| Sicherheitswerkbank        | Lamin Air® HBB 2448 | Heraeus Instruments             |
| Spektralphotometer         | NanoDrop™ 2000c     | ThermoFisher Scientific         |
| Sterilisator               | SUT6760             | Hereus                          |
| Stromversorger             | Power Pac 200       | BioRad                          |
| Stromversorger             | PowerPac™ HQ        | BioRad                          |
| Thermalcycler              | C1000™              | BioRad                          |
| Thermalcycler              | PTC-200 Peltier     | MJ Research                     |
| Thermomixer                | Model 5436          | Eppendorf                       |
| Vortexmischer              | VF                  | Janke & Kunkel                  |
| Wasseranlage               | GenPure             | TKA                             |
| Wasserbad                  | 1003                | GFL                             |
| Zentrifuge (Mikro-)        | C5417R              | Eppendorf                       |
| Zentrifuge (Tisch-)        | Allegra X-15R       | Beckman Coulter                 |

## 2.5 Größenstandard

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Größenstandard für die Agarose-Gelelektrophorese handelt es sich um den GeneRuler™ DNA Ladder Mix. Dieser stammt von der Firma ThermoFisher Scientific. Im Anhang ist das Bandenprofil des GeneRuler™ DNA Ladder Mix dargestellt.

## 2.6 Kulturmedien

### Infektionsmedium:

Das Infektionsmedium diente der Infektion von *swine testicular* (ST)-Zellen. Es besteht aus High Glukose DMEM, GlutaMax (von der Firma Gibco/Thermo), welches mit 2 µg/ml Trypsin/EDTA versetzt wurde.

### LB (Luria-Bertani-Broth)-Medium:

Das LB-Medium diente zusammen mit Agar dem Gießen der Agarplatten, auf welche die transformierten Kolonien wuchsen. Weiterhin wurde das Medium ohne Agar zur Beimpfung der Übernachtskultur der Bakterien verwendet. Zur Selektion positiv transformierter Kolonien enthielten sowohl die Flüssigkulturen als auch die Agarplatten Ampicillin (Amp) mit einer Konzentration von 100 µg/ml. Die Inhaltsstoffe für die Herstellung des Mediums können der Tabelle 4 entnommen werden. Die LB-Bouillon stammt von der Firma Sigma, besitzt die Artikelnummer L3022-1KG.

**Tabelle 4:** Komponenten zur Herstellung des LB-Mediums.

| Beschreibung                 | Menge  |
|------------------------------|--------|
| Casein (enzymatisch verdaut) | 10 g/l |
| Hefeextrakt                  | 5 g/l  |
| Natriumchlorid               | 5 g/l  |

### SOC (*super optimal catabolic*)-Medium:

Das Medium wurde für die Transformation der chemisch kompetenten *E.coli*-Zellen verwendet. Die Inhaltsstoffe des Mediums sind in der Tabelle 5 dargestellt.

**Tabelle 5:** Komponenten zur Herstellung des SOC-Mediums.

| <b>Beschreibung</b> | <b>Menge</b> |
|---------------------|--------------|
| Hefeextrakt         | 0,5 %        |
| Trypton             | 2,0 %        |
| Natriumchlorid      | 10,0 mM      |
| Kaliumchlorid       | 2,5 mM       |
| Magnesiumchlorid    | 10,0 mM      |
| Magnesiumsulfat     | 10,0 mM      |
| Glukose             | 20,0 mM      |

Wachstumsmedium:

Das Wachstumsmedium zur Kultivierung der eukaryotischen Zellen besteht aus High Glukose DMEM, GlutaMax (von der Firma Gibco/Thermo) und wurde mit 10 % FKS versetzt.

**2.7 Oligonukleotide**

Die nachfolgende Tabelle 6 stellt die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer dar. Diese wurden synthetisiert und bei der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH in Auftrag gegeben.

**Tabelle 6:** Verwendete Primer.

| <b>Name</b>            | <b>Sequenz (5' → 3')</b>          | <b>Verwendung</b> |
|------------------------|-----------------------------------|-------------------|
| pJET1.2/<br>Blunt Forw | CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC           | Kolonie-PCR       |
| pJET1.2/<br>Blunt Rev  | AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG          |                   |
| RVANSP4s               | GGCTTTAAAAAGTTCTGTTCCGAGAGAGC     | RT-PCR            |
| RVANSP4as              | GGTCACATTAAGACCGTTCCTTCCATTAACG   |                   |
| RVANSP4-<br>GACCas     | ACATTAAGACCGTTCCTTCCATTAACG       | RT-PCR            |
| RVCNSP4s               | GGCTTTAAATTTTTCAGATCACTTTGCTCTACG | RT-PCR            |
| RVCNSP4as              | AGCCACATGAATTTTTCACATCTTCATCGATC  |                   |

| Name            | Sequenz (5' → 3')                                       | Verwendung |
|-----------------|---|------------|
| T7RVA_<br>NSP4s | TAATACGACTCACTATAGGGCTTTAAAAAGTT<br>CTGTTCCGAGAGAGCGCG  | RT-PCR     |
| T7RVC_<br>NSP4s | TAATACGACTCACTATAGGGCTTTAAATTTTT<br>CAGATCACTTTGCTCTACG | RT-PCR     |

## 2.8 Probenmaterial

In der vorliegenden Arbeit wurde Probenmaterial verwendet, welches bereits im Rahmen der Routinediagnostik im Institut für Virologie der Veterinärmedizinischen Fakultät Leipzig mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) und Polymerase Kettenreaktion (PCR) analysiert wurde. Die gesammelten Proben stammen hierbei aus Saugferkelbeständen aus ganz Deutschland und umfassen neben Serummaterial der Sau und der Ferkel auch Milchproben. In die Studie wurden darüber hinaus sowohl Tiere, welche zum Probenahmezeitpunkt eine Symptomatik aufwiesen, als auch Tiere ohne Anzeichen einer Erkrankung aufgenommen. Die Tabelle 7 listet die Ergebnisse des kommerziellen ELISA-Reagensystems zum Antikörper-Nachweis der Firma Bio-X Diagnostics auf. Es handelt sich hierbei um einen kompetitiven Immunassay, bei dem ein Inhibitionswert von  $\leq 20$  % als negativ für spezifische Antikörper zu werten ist. Die genauen Gleichungen zur Berechnung der einzelnen Werte können dem zugehörigen Manuel des Herstellers entnommen werden. Ebenfalls in der Tabelle 7 dargestellt sind die Ergebnisse der PCR zum Erregernachweis, welche nach Schwarz et al., 2002 für RVA sowie Alfieri et al., 1999 und Chun et al., 2010 für RVC durchgeführt wurde.

**Tabelle 7:** Im Rahmen der Studie verwendetes Probenmaterial.

| Bestand | Ohrmarken<br>Sau | ELISA-Resultat |       |          |          | PCR-Resultat | Durchfall |
|---------|------------------|----------------|-------|----------|----------|--------------|-----------|
|         |                  | Serum          | Milch | Serum    | Serum    |              |           |
|         |                  | Sau            | Sau   | Ferkel 1 | Ferkel 2 |              |           |
| 1       | 319              | 19,3           | 39,91 | 7,30     | 9,31     | RVC positiv  | ohne      |
| 1       | 362              | 48,4           | 35,62 | 7,75     | 24,53    | RVA positiv  | ohne      |
| 2       | 2296             | 8,9            | 29,10 | 73,97    | 16,50    | RV negativ   | ohne      |
| 3       | 415              | 5,8            | 14,83 | 49,11    | 51,78    | RV negativ   | mit       |
| 7       | 198              | 13,09          | 2,66  | 73,48    | 82,51    | RVA positiv  | ohne      |
| 8       | 27456            | 20,15          | 9,84  | 57,79    | 80,89    | RVC positiv  | ohne      |
| 10      | 3391             | 48,48          | 92,99 | 94,45    | 93,29    | RVA positiv  | mit       |
| 11      | 230              | 11,83          | 19,94 | 60,55    | 82,20    | RVC positiv  | mit       |
| 13      | 28               | 40,60          | 21,49 | 69,87    | 55,69    | RVC positiv  | mit       |
| 14      | 852              | 5,51           | 8,98  | 3,15     | 44,79    | RVA positiv  | mit       |

## 2.9 Reaktionssysteme

### CloneJET PCR Cloning Kit:

Anwendung fand dieses Kit analog nach Herstellerprotokoll bei der Klonierung von PCR-Produkten. Das Kit wurde bei der Firma ThermoFisher Scientific käuflich erworben und bei -20°C gelagert. Bei dem hier verwendeten Vektor handelt es sich um pJET1.2/Blunt.

Der pJET1.2/Blunt ist ein linearisierter Klonierungsvektor (Vektorkarte siehe Anhang), der Inserts von 6 bp bis 10 kb akzeptiert. An den 5'-Enden sind Phosphorylgruppen enthalten, wodurch eine Phosphorylierung der Primer nicht notwendig ist. PCR-Produkte, welche ein Blunt-Ende besitzen und durch eine *proofreading* DNA-Polymerase generiert wurden, können direkt an den Vektor ligiert werden. Jene PCR-Produkte, welche aufgrund von *nonproofreading* thermostabilen DNA-Polymerasen 3'-dA-Überhänge aufweisen, werden mittels des DNA Blunting Enzyms gebluntet und können so schließlich an den Vektor ligiert werden.



GeneJET PCR Purification Kit:

Das Kit wurde zur Reinigung der PCR-Produkte verwendet und stammt von der Firma ThermoFisher Scientific. Es wurde bei Raumtemperatur gelagert. Der Ablauf wurde analog zum Herstellerprotokoll vorgenommen.

Das PCR-Produkt wird mittels Bindepuffer an eine Silica-Säule gebunden, wobei ein chaotropes Mittel in diesem zur Denaturierung von Proteinen führt und somit eine Bindung der DNA an die Säule fördert. Verunreinigungen werden mittels Waschpuffer entfernt um schließlich mit Hilfe des Elutionspuffers die DNA von der Säule zu eluieren.

Metafectene® Pro:

Das Metafectene® Pro wurde bei der Transfektion von BSR-T7-Zellen genutzt. Dabei wurde Plasmid-DNA, welche zuvor durch Plasmidpräparation gewonnen werden konnte, in die eukaryotischen Zellen transfiziert. Die optische Konfluenz der Zellen musste hierbei über 90 bis 100 % betragen.

peqGOLD RNA Purification Kit:

Das Kit stammt von der Firma ThermoFisher Scientific und diente der Isolierung qualitativ hochwertiger Gesamt-RNA. Die Lagerung sowie Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Die Reinheit sowie die Konzentration des gereinigten Produkts wird schließlich mittels NanoDrop gemessen.

QIAprep® Spin Miniprep Kit:

Das Kit wurde für die Isolierung von Plasmid-DNA verwendet und wurde bei der Firma Qiagen erworben. Das Reaktionssystem mit den dazugehörigen Komponenten wurde bei Raumtemperatur gelagert. Die Durchführung erfolgte analog zum Herstellerprotokoll, wobei die Reinheit sowie die Konzentration des entstandenen Produkts mittels NanoDrop gemessen wurden.

#### T7 mScript™ Standard mRNA Production Kit:

Das T7 mScript mRNA Production System diente dem Cappen und Polyadenylieren des mRNA-Transkripts. Die Lagerung sowie die Durchführung erfolgten nach den Herstellerangaben von der Firma CellScript.

#### TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit:

Das TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit diente der Umschreibung von DNA in RNA (siehe Kapitel 3.3.2). Das Kit stammt von der Firma Thermo Scientific und ist für 50 Reaktionen ausgelegt. Die Artikelnummer beträgt #K0441 und besitzt die Lotnummer 00212766. Das Kit wurde nach Herstellerangaben gelagert.

#### TransIT® -mRNA Transfection Kit:

Das TransIT® -mRNA Transfection Kit wurde bei der Transfektion von MA-104- und BSR-T7-Zellen angewandt. Dabei wurde mRNA (durch *in vitro* Transkription gewonnen) in die Zellen transfiziert. Die optische Konfluenz der Zellen musste hierbei über 80 % betragen. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

#### TurboFect Transfection Reagent:

Das TurboFect Transfection Reagent wurde bei der Transfektion von BSR-T7-Zellen angewandt. Dabei wurde Plasmid-DNA (durch Plasmidpräparation gewonnen) in die Zellen transfiziert. Die optische Konfluenz der Zellen musste hierbei 70 bis 90 % betragen. Das TurboFect wurde in einem 4°C Kühlschrank gelagert.

## **2.10 Vektorsystem**

Für die Klonierung der PCR-Produkte wurde der pJET1.2/Blunt-Vektor verwendet. Die Plasmidkarte mit den dazugehörigen Vektorelementen sowie deren Funktionen kann dem Anhang II entnommen werden.

## 2.11 Verbrauchsmaterialien

Die in der Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien können der Tabelle 8 entnommen werden. Es wurde stets mit sterilen Glas- und Kunststoffmaterialien gearbeitet.

**Tabelle 8:** Verwendete Verbrauchsmaterialien.

| <b>Beschreibung</b>  |  | <b>Hersteller</b>          |
|----------------------|--|----------------------------|
| Chamber Slide        | (8 Wellformat, 10 Wellformat)            | Greiner Bio-One            |
| Deckgläscher         | (Ø 13 mm)                                | Carl Roth                  |
| Messpipette          | (2 ml, 5 ml, 10 ml)                      | Sarstedt                   |
| Parafilm             |  | Pechiney Plastic Packaging |
| PCR-Gefäß            | (0,2 ml)                                 | Eppendorf                  |
| Petrischalen         | (Ø 10 cm)                                | Greiner Bio-One            |
| Pipettenspitzen      | (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)  | Greiner Bio-One            |
| Reaktionsgefäß       | (1,5 ml, 2 ml)                           | Greiner Bio-One            |
| Spitzenvorsatzfilter | (0,2 µm)                                 | Greiner Bio-One            |
| Kavitätenplatte      | (24 Well, 96 Well)                       | Greiner Bio-One            |
| Zellkulturflasche    | (25 m <sup>2</sup> , 75 m <sup>2</sup> ) | Greiner Bio-One            |
| Zentrifugenröhrchen  | (15 ml, 50 ml)                           | Greiner Bio-One            |

## 2.12 Virusstämme

In der nachfolgenden Tabelle 9 sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Rotavirusstämme dargestellt.

**Tabelle 9:** Verwendeten Virusstämme.

| <b>Art</b>  | <b>Stamm</b> | <b>Bezeichnung</b>                         |
|-------------|--------------|--|
| Rotavirus A | OSU G5P[7]   | Kultivierbarer porzin-Rotavirus<br>A-Stamm |
| Rotavirus C | AmC-1/Cowder | Kultivierbarer porzin-Rotavirus<br>C-Stamm |

## 2.13 Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurde auf verschiedene Mammalia-Zelllinien zurückgegriffen.

Die BSR-T7-Zelllinie wurde für die Transfektion mittels Metafectene® Pro, TurboFect Transfection Reagent und TransIT® -mRNA Transfection Kit verwendet. Die Zellen wurden aus BHK-21-Zellen (ATCC: CCL-10; *Baby Hamster Kidney cells*) gewonnen. Es handelt sich um fibroblastenähnliche-adhärenzte Zellen, die aus den Nieren von syrischen Goldhamstern (*Mesocricetus auratus*) stammen. Diese wurden mit dem Vektor pSC6-T7-NEO transfiziert, welcher das T7-RNA-Polymerasegen kodiert (Buchholz et al., 1999). Für die Transfektion in einem 96-Wellformat hat sich nach 28 h eine Zellzahl von  $2 \cdot 10^5$  Zellen/ml als optimal herausgestellt.

Weiterhin wurden die Zelllinien MA-104 (ATCC: CRL-2378) und ST (ATCC: CRL-1746) verwendet. Beide Zelllinien dienen der Infektion mit RVA (MA-104-Zellen) und RVC (ST-Zellen). Die MA-104-Zellen wurden ebenfalls zur Transfektion von mRNA verwendet.

Die MA-104-Zelllinie stammt aus der Epithelzellschicht der Nieren grüner Meerkatzen (*Cercopithecus aethiops*). Diese wurden im Embryostadium entnommen. Die MA-104-Zellen haben die Eigenschaft, dass sie ein adhärenztes Wachstum aufweisen und fibroblastenähnlich sind. Für die Infektion und die Transfektion mittels Metafectene® Pro sowie TransIT™ hat sich nach 28 h eine Zellzahl von  $4,5 \cdot 10^4$  Zellen/ml für eine Kavität einer 96-Wellplatte als optimal herausgestellt.

Bei den ST-Zellen handelt es sich um fibroblastenähnliche-adhärenz wachsende Zellen. Diese stammen von den Hoden männlicher Schweine (*Sus scrofa*). Für die Infektion in der Kavität einer 96-Wellplatte hat sich nach 20 h eine Zellzahl von  $1 \cdot 10^5$  Zellen/ml als optimal herausgestellt.

## 3 Methoden

### 3.1 Molekulare Klonierung

#### 3.1.1 RNA-Isolation

Die RNA wurde analog der Herstellerangaben mittels peqGOLD Total RNA Kit oder GeneJET RNA Purification Kit isoliert. Die Isolation diente dem RNA-Gewinn aus Virusstock, Probenmaterial und nach der *in vitro* Transkription. Die Lagerung der RNA erfolgte in einem -80°C Tiefkühler. Bei Verwendung der RNA wurde diese stets auf Eis transportiert.

Bei Verwendung des peqGOLD Total RNA Kits wurde Probenmaterial mit 400 µl RNA Lysis-Puffer T versetzt und gründlich durch Pipettieren gemischt. Das Lysat wurde anschließend auf die im Kit enthaltene DNA Removing Column pipettiert. Es folgte eine Zentrifugation für eine Minute bei 12000 x g. Der Säulendurchfluss wurde im Anschluss in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Zu dem bereits vorhandenen Säulendurchfluss wurde ein identisches Volumen an 70 % Ethanol gegeben. Die Lösung wurde durch Pipettieren sorgfältig gemischt und auf die im Kit enthaltene PerfectBind RNA Column gegeben. Nach einer Zentrifugation für eine Minute bei 10000 x g wurde der Durchfluss verworfen und die PerfectBind RNA Column in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß gesteckt. Nach Zugabe von 500 µl Waschpuffer I auf die Säule wurde diese für 15 sek bei 10000 x g zentrifugiert. Der Säulendurchfluss wurde verworfen und als nächster Schritt direkt 600 µl des komplettierten Waschpuffer II auf die PerfectBind Column pipettiert. Es folgte eine Zentrifugation für 15 sek bei 10000 x g. Der Waschschrift wurde wiederholt und der Durchfluss verworfen. Zum Trocknen und dem Entfernen des Ethanols wurde die Säule in ein leeres 2 ml Reaktionsgefäß gesteckt und für zwei Minuten bei 10000 x g zentrifugiert. Eluiert wurde durch Zugabe von 50 µl RNase-freiem dH<sub>2</sub>O. Die Säule wurde vorerst in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gesteckt und das dH<sub>2</sub>O direkt auf die Matrix pipettiert. Nach einer Zentrifugation von einer Minute bei 5000 x g wurde das Eluat aus dem Reaktionsgefäß entnommen und erneut auf die Matrix pipettiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde die Säule verworfen und die Konzentration der RNA mittels NanoDrop gemessen. Die RNA wurde nach der Gewinnung stets gekühlt und in einem -80°C Tiefkühler gelagert.

Bei Einsatz des GeneJET RNA Purification Kits wurden 100 µl Probenmaterial mit 300 µl Lyse-Puffer versetzt und durch Pipettieren gemischt. Lagen weniger als 100 µl Probenmaterial vor, wurde mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf 100 µl aufgefüllt. Nach Zugabe des Lyse-Puffers wurden 180 µl 100% Ethanol zu der Lösung gegeben und erneut durch Pipettieren gut

gemischt. Im Anschluss wurde das Lysat auf die im Kit enthaltene GeneJET RNA Purification Column pipettiert. Es folgte eine Zentrifugation für eine Minute bei 12000 x g. Der Säulendurchfluss wurde entfernt und die Säule in einem neuen 2 ml Reaktionsgefäß platziert. Nachdem 700 µl des Waschpuffers I auf die Säule pipettiert wurden, erfolgte eine Zentrifugation für eine Minute bei 12000 x g. Der Säulendurchfluss wurde entfernt und 600 µl des komplettierten Waschpuffers II hinzugegeben. Nach einer Zentrifugation für eine Minute bei 12000 x g wurde der Säulendurchfluss erneut verworfen und es folgte die Zugabe von 250 µl des komplettierten Waschpuffers II. Nach 2-minütiger Zentrifugation bei 12000 x g wurde der Durchfluss entfernt und es schloss sich eine erneute Zentrifugation für eine Minute bei 12000 x g an. Dies diente der Trocknung und Entfernung des restlichen Ethanol aus der Säule. Im Anschluss wurde die GeneJET RNA Purification Column in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die RNA mit 50 µl nukleasefreiem Wasser eluiert. Dabei wurde das Wasser auf die Matrix pipettiert. Nach einer Zentrifugation für eine Minute bei 12000 x g wurde das Eluat erneut auf die Matrix pipettiert. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation. Zum Schluss wurde die Säule entfernt und die Konzentration des Eluats mittels NanoDrop gemessen.

### 3.1.2 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription (RT) diente der Synthetisierung von komplementärer DNA (cDNA) aus RNA. Dies war notwendig, da es sich bei den Rotaviren um Viren mit einem Genom aus dsRNA handelt und die Taq-Polymerase für die Polymerase Kettenreaktion (PCR) eine DNA-abhängige DNA-Polymerase ist.

Die Zusammensetzung der RT umfasste sowohl 0,5 µl des sense- als auch 0,5 µl des antisense-Primers. Diese lagerten in einem -20°C Tiefkühler und lagen in einer Stocklösung mit 100 pmol/µl vor, welche mit einer Konzentration von 10 pmol / µl eingesetzt wurden. Weiterhin wurden 6,5 µl DEPC-H<sub>2</sub>O, 1 µl dNTPs (jeweils 10 mM) und jeweils 5 µl RNA der Proben hinzugefügt. Als Negativkontrolle (NK) wurde anstelle der RNA nur DEPC-H<sub>2</sub>O verwendet. Nach einer ausreichenden Durchmischung der Lösungen wurden die 0,2 ml Reaktionsgefäße für 5 min bei 95°C im Thermalcycler erhitzt. Anschließend folgte eine sofortige Abkühlung im Eisbad. Dies hatte die Auftrennung der RNA-Doppelstränge und Sekundärstrukturen zur Folge, so dass sich die Primer effizient an die ssRNA anlagern konnten. In der Zeit der Abkühlung wurde ein Mastermix vorbereitet, der im Anschluss mit einer Menge von jeweils 6,5 µl auf die Reaktionsgefäße aufgeteilt wurde. Die

Zusammensetzung für einen Probenansatz bestand aus 4 µl des 5x First Strand-Puffers, 1 µl Ribolock (1 U/µl), 1 µl Dithiothreitol (100 mM) und 0,5 µl der Reversen Transkriptase Superscript III. Nachfolgend wurden die Reaktionsgefäße für 60 min bei 55°C inkubiert, was zur Elongation und der Umschreibung von RNA zu cDNA führte. Für die Inaktivierung des Enzyms erfolgte die Erwärmung der Lösungen für 15 min bei 70°C statt. Die gewonnene cDNA wurde bis zum zeitnahen Gebrauch bei 4°C gelagert.

### 3.1.3 PCR zur Gewinnung von DNA-Inserts

Die PCR diente der Vervielfältigung der Rotaviren-RNA, da diese für die weiteren Versuchsdurchführungen von Belangen war. Hierbei wurde die aus der Reversen Transkription entstandene cDNA als Template verwendet.

Die bei der PCR verwendeten spezifischen Primer entsprachen die der RT, doch wurde ein Volumen von jeweils 1,25 µl verwendet. Ebenfalls wurden dNTPs mit einem Volumen von 0,5 µl und 11,75 µl DEPC-H<sub>2</sub>O verwendet. Des Weiteren wurden 5 µl des 5x Q5 Puffers, 0,25 µl des Enzyms Q5 HotStart-Polymerase (2 U/µl) und 5 µl der cDNA, die jedoch vorher 1:10 verdünnt wurde, hinzupipettiert. Als Negativkontrolle diente anstelle der cDNA das DEPC-H<sub>2</sub>O. Die PCR-Ansätze wurden in 0,2 ml Reaktionsgefäße angefertigt und durch Pipettieren durchmischt. Im Anschluss inkubierten die Reaktionsgefäße im Thermalcycler C1000™. Das Programm zur PCR kann der Tabelle 10 entnommen werden. Die Q5 HotStart-Polymerase wurde aufgrund ihrer *proofreading*-Aktivität verwendet, d.h. sie führt während der PCR Korrekturmaßnahmen durch. Dadurch werden Replikationsfehler erkannt und korrigiert. Die DNA-Polymerase erkennt, welcher Strang der neusynthetisierten DNA-Doppelhelix den Fehler enthält und schneidet die falsche Base heraus. Im Anschluss wird das ausgeschnittene Stück durch die richtige, komplementäre Nukleotidbase ersetzt und schließlich kommt es zur Wiederverknüpfung der Fragmente.

**Tabelle 10:** Programm für die PCR.

| Phase                  | T [°C] | t [sek] | Zyklen |
|------------------------|--------|---------|--------|
| Initiale Denaturierung | 98     | 30      | -      |
| Denaturierung          | 98     | 10      |        |
| Annealing              | 60     | 20      | 30     |
| Elongation             | 72     | 25      |        |
| Finale Elongation      | 72     | 120     | -      |

Die Denaturierung fand bei 98°C statt, dabei trennten sich die beiden Stränge der Template-DNA. Im Anschluss wurde die Temperatur auf 60°C gesenkt, sodass es zu einer Hybridisierung der Oligonukleotidprimer an die einzelsträngige DNA kommen konnte. Danach wurde die Temperatur auf 72°C erhöht. Dies hatte zur Folge, dass die Primer verlängert wurden und erneut eine doppelsträngige DNA vorliegen konnte, die der ursprünglichen Template-DNA exakt glich. Da die Komplementierung an beiden Strängen der DNA abläuft, wurde in einem Zyklus die Template-DNA verdoppelt. In der vorliegenden Arbeit wurden bei der PCR stets 30 Zyklen durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden schließlich bei 4°C gelagert.

### **3.1.4 Ligation**

Die Ligation diente der Einbringung der PCR-Fragmente von NSP4-Sequenzen des RVA bzw. RVC in einen Vektor. Dabei stellte der Vektor pJET1.2/Blunt den Zielvektor dar. Dieser Schritt erfolgte analog zum Herstellerprotokoll des CloneJET PCR Cloning Kits.

In einem 0,2 ml Reaktionsgefäß wurden 10 µl des 2x Reaktionspuffers, 1 µl des 25 bis 50 ng PCR-Produkts, 7 µl DEPC-H<sub>2</sub>O, 1 µl T4 DNA Ligase (5 U/µl) und 1 µl des pJET1.2/blunt Cloning Vektors (50 ng/µl) zusammengeführt. Das Reaktionsgefäß wurde während der gesamten Zeit auf Eis gekühlt. Nachdem die Reagenzien durch Pipettieren gut durchmischt wurden, folgte eine Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur. Die Lösung wurde erneut gut durchmischt und konnte sofort für die Transformation verwendet werden.

### **3.1.5 Agarose-Gelelektrophorese zu Visualisierung von DNA**

Für die Trennung sowie zum Nachweis der DNA-Fragmente wurde eine Agarose-Gelelektrophorese angewandt. Die spätere Visualisierung der Fragmente erfolgte durch Ethidiumbromid, wodurch die Banden mit Hilfe von ultraviolettem Licht detektiert werden konnten.

Zu Beginn musste daher ein Agarosegel hergestellt werden. Aufgrund der Größe des gewünschten Gens (ca. 750 bp) wurde ein 1,5 % Agarosegel angefertigt. Zur Herstellung des Gels wurde LE-Agarose abgewogen und diese anschließend in 1x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) gelöst. Die Lösung wurde unter Zuhilfenahme der Mikrowelle solange erhitzt, bis diese klar wurde. Vor der Zugabe des roten Farbstoffs Ethidiumbromid musste die Lösung abgekühlt werden, da es sonst zur Bildung von Aerosolen kommen könnte, die schädigend auf



die Gesundheit wirken. Nach der Abkühlung des 1,5 % Agarosegels wurden 3 µl Ethidiumbromid der Stocklösung 5 mg/ml hinzugegeben und die Lösung gut gemischt. Diese wurde schließlich in den Gelschlitten gegeben und es folgte der Einsatz eines Kammes, so dass es zur Bildung von Taschen innerhalb des Gels kommen konnte. Nach dem Aushärten des Gels für 20 bis 30 min bei Raumtemperatur konnte der Gelschlitten in die Elektrophoresekammer, gefüllt mit Elektrophoresepuffer (1x TAE), eingesetzt werden. Der Kamm wurde aus dem Agarosegel entnommen und die entstandenen Taschen wurden mit PCR-Produkt, der Negativkontrolle sowie 2,5 µl des GeneRuler DNA Ladder Mix befüllt. Der GeneRuler DNA Ladder Mix dient der Größenbestimmung und Quantifizierung von Nukleinsäuren auf Agarosegelen. Vor dem Auftragen des PCR-Produkts und der Negativkontrolle musste 6x DNA Loading Dye mit diesen 1:6 verdünnt werden. Der 6x Loading Dye bedingt eine Erhöhung der Dichte und gewährleistete somit eine präzise Beladung der Proben in die Taschen des Gels. Mit Hilfe des Stromerzeugers PowerPac™ HQ wurde die Gelelektrophoresekammer bei 130 V für 40 bis 45 min in Betrieb genommen. Dies führte zur Trennung der Nukleinsäure nach ihrer Größe und Masse. Aufgrund physiologischer Bedingungen liegt der Phosphat-Rest des Zucker-Phosphat-Rückgrats deprotoniert vor und besitzt somit eine negative Ladung. Dies führt dazu, dass die negativ geladenen Moleküle im elektrischen Feld wandern und eine Trennung der Nukleinsäure möglich ist. Nach dem Durchlauf des Gels wurde dieses schließlich von dem Gelschlitten getrennt und in dem Detektor Fusion-FX7 platziert. Wie bereits erwähnt, konnten die Banden unter UV-Licht mit Hilfe des Phenanthridin-Farbstoffes Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden. Die Ethidiumbromid-Moleküle interkalieren zwischen die Basen der Nukleinsäure und verändern somit deren Absorptionsspektrum. Die Fluoreszenz wird schließlich durch Anregung mit UV-Licht stark erhöht, sodass es zu einem hellen Aufleuchten an den Stellen im Agarosegel kommt, an denen sich Nukleinsäuren befinden. Die Stellen im Agarosegel, die keine Nukleinsäure besitzen, erscheinen dunkel.

### **3.1.6 DNA-Sequenzierung**

Die Sequenzierungen wurden von der Firma Microsynth Seqlab (SEQLAB Sequence Laboratories Göttingen GmbH, Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Ausgewählte Plasmide mit einem Insert der richtigen Größe wurden unter Verwendung der PCR-spezifischen Primer sequenziert. Für die Sequenzierung wurden 12 µl Plasmid mit je 20 µl des pJET1.2 Forward-Primers bzw. 20 µl des pJET1.2 Reverse-Primers versandt. Nach dem Erhalt der Sequenzen

erfolgten die Auswertungen unter Zuhilfenahme des Programms GENTle am Institut für Virologie. Hierbei wurden die erhaltenen Sequenzdaten mit denen in der Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) abgeglichen.

### **3.1.7 Isolierung von PCR-Fragmenten**

Nach der Gewinnung des PCR-Produkts musste dieses gereinigt werden, um Proteine und Salze aus der Lösung zu entfernen um einen Pufferwechsel für nachfolgende Reaktionen vornehmen zu können. Die Reinigung der Produkte erfolgte analog des Herstellerprotokolls des GeneJET PCR Purification Kits.

Das PCR-Produkt wurde im Verhältnis 1:2 mit dem Bindepuffer gemischt und anschließend auf ein Reaktionsgefäß mit Silica-Säule pipettiert. Es folgte die Zentrifugation des Reaktionsgefäßes für 30 sek bei 12000 x g. Der Durchfluss konnte verworfen werden, da die gewünschten DNA-Fragmente an der Säule absorbierten. Die Zugabe von 700 µl Waschpuffer sowie eine erneute Zentrifugation für 30 sek bei 12000 x g führten zu der Reinigung des PCR-Produkts an der Säule. Eine wiederholte Zentrifugation ohne Zugabe von weiteren Puffern bewirkte nach einer Minute bei 12000 x g das Entfernen des restlichen Waschpuffers und des darin enthaltenen Ethanol. Im Anschluss wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und es folgte die Zugabe von 50 µl des Elutionspuffers. Zum Schluss schloss sich eine Zentrifugation von einer Minute bei 12000 x g an, wobei sich das Eluat im Reaktionsgefäß ansammelte. Dieser Schritt wurde wiederholt, indem das Eluat mit Hilfe einer Pipette erneut auf die Säule aufgetragen wurde. Somit wurde sichergestellt, dass möglichst viele der DNA-Fragmente gewonnen werden konnten. Die Konzentration des gereinigten PCR-Produkts wurde schließlich mittels des NanoDrop gemessen. Alle Puffer waren Bestandteil des kommerziellen Reaktionssystems.

## **3.2 Prokaryotische Zellkultur**

### **3.2.1 Transformation von chemisch kompetenten Bakterien**

Bei der Transformation wird die rekombinante Plasmid-DNA in bakterielle Zellen eingebracht, welche wachsen und den Vektor und somit auch die Ziel-DNA vervielfältigen.

Für die Transformation wurden chemisch kompetente *E.coli* XL10-Gold-Zellen verwendet. Diese besaßen keine natürliche Kompetenz zur Aufnahme von Fremd-DNA, wurden jedoch

mittels Calcium-Chlorid kompetent gemacht. Die Aliquots, welche im Institut für Virologie der veterinärmedizinischen Fakultät in Leipzig bereits vorrätig waren, lagen á 50 µl vor. Durch die positive Ladung der Calcium-Ionen, welche zur Kompetenz der Bakterien führten, wurde die negative Ladung der bakteriellen Zellwand neutralisiert. Dadurch kommt es zur Zerstörung der elektrostatischen Abstoßung und damit zu einer Schwächung der Zellwandstabilität. Nach Zugabe von 4 µl des Ligationsproduktes aus Kapitel 3.1.4 folgte eine Inkubation für 30 min auf Eis. Durch einen anschließenden Hitzeschock der Lösung für genau 30 sek bei 42°C kam es zu einem Druckunterschied zwischen der inneren Zellmembran und äußeren Zellwand, woraufhin sich Poren bildeten. Durch diese drang das Plasmid in *Supercoil*-Form in die Zelle ein. Nach kurzem Abkühlen auf Eis gelang es der Zelle ihre Zellwand teilweise zu regenerieren. Es folgte die Zugabe von 300 µl SOC-Medium, welches zur Steigerung der Transformationseffizienz beiträgt und als sehr gutes Nährmedium für die geschwächten Bakterien dient. Danach schloss sich ein Wärmebad bei 37°C für 60 min. Im Anschluss wurden die transformierten Bakterien auf einer LB-Agarplatte mit 100 µl/ml Ampicillin ausplattiert. Das Wachstum der Bakterien erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C über Nacht bei dem sich die Bakterien vollständig regenerieren konnten. Eine Lagerung der ausgestrichenen Kolonien erfolgte auf LB-Agarplatten bei 4°C.

### 3.2.2 Kolonie-PCR

Die nach der Transformation ausplattierten Bakterien bildeten Kolonien, welche zu weiteren Untersuchungen dienten. Um herauszufinden, welche Kolonie die gewünschte Sequenz des Rotavirus-NSP4 besitzt, wurden einige Kolonien ausgewählt und für die Kolonie-PCR herangezogen.

Vor Einsatz der Kolonien wurden die benötigten Reagenzien für die PCR in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß zusammengeführt. Die Zusammensetzung beinhaltete 0,5 µl pJET1.2 Forward Primer und 0,5 µl pJET1.2 Reverse Primer zu je 10 pmol/µl, 0,5 µl dNTPs (je 10 mM), 2 µl 10x DreamTaq-Puffer, 16,25 µl DEPC-H<sub>2</sub>O und 0,25 µl der DreamTaq-Polymerase (5 U/µl). Der DreamTaq-Puffer beinhaltete bereits einen *Loading Dye*, wodurch für die nachfolgende Agarose-Gelelektrophorese keine weitere Zugabe nötig war. Nach Anfertigung der Lösung wurden die einzelnen Kolonien durch die Benutzung einer sterilen Pipettenspitze hinzugefügt. Unter Zuhilfenahme des Thermal Cycler C1000<sup>TM</sup> inkubierte das Reaktionsgefäß wie in Tabelle 11 gezeigt.

**Tabelle 11:** Thermalprogramm für die Kolonie-PCR.

| Phase                  | Temperatur [°C] | Dauer [sek] | Zyklen |
|------------------------|-----------------|-------------|--------|
| Initiale Denaturierung | 95              | 180         | -      |
| Denaturierung          | 95              | 20          |        |
| Annealing              | 58              | 30          | 30     |
| Elongation             | 72              | 60          |        |
| Finale Elongation      | 72              | 120         | -      |

Die Denaturierung fand bei 95°C statt, dabei trennten sich die beiden Stränge der Plasmid-DNA. Im Anschluss wurde die Temperatur auf 58°C gesenkt, sodass es zu einer Hybridisierung der pJET1.2/blunt Forward- und pJET1.2/blunt Reverse-Primer an die einzelsträngige DNA kommen konnte. Danach wurde die Temperatur auf 72°C erhöht. Dies hatte zur Folge, dass die Oligonukleotidprimer durch die DNA-abhängige DNA-Polymerase verlängert wurden und erneut eine doppelsträngige DNA vorliegen konnte, die der ursprünglichen Plasmid-DNA exakt gleich. Da die Komplementierung an beiden Strängen der Plasmid-DNA abläuft, wurde diese in jedem Zyklus verdoppelt. In der vorliegenden Arbeit wurden bei der Kolonie-PCR stets 30 Zyklen durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden entweder sequenziert oder es erfolgte eine Minipräparation zur Gewinnung der Plasmide. Die PCR-Produkte wurden schließlich bei 4°C gelagert.

### 3.2.3 Plasmidpräparation

Für die Isolierung des Plasmids aus den transformierten Bakterien wurden die Zellen verwendet, deren Kolonie bei der Kolonie-PCR die gewünschte Fragmentgröße aufwies und damit höchstwahrscheinlich die gewünschte Zielsequenz besaß.

Die Bakterien wurden über Nacht für 16 h in flüssiges LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin gegeben und inkubierten während dieser Zeit auf dem Schüttelinkubator Orbital Shaker 4518 bei 37°C und 220 rpm. Aus der Übernachtskultur wurden 500 µl entnommen und im Verhältnis 1:2 mit 87 % Glycerin gemischt und bei -80°C gelagert. Die Glycerinkultur diente hierbei der langfristigen Aufbewahrung. Somit können LB-Flüssigkulturen ohne eine vorangegangene Transformation beimpft werden. Das Glycerin verringert bei dem Einfrieren die Bildung von Eiskristallen sowie während des Auftauprozesses die Zerstörung der Zellwände. Die restliche Kultur wurde für 20 min bei 4000 x g und 4°C mit Hilfe des Allegra

X-15R zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand dekantiert und das Pellet analog zu dem Herstellerprotokoll des QiAprep® Spin Miniprep Kits verwendet.

Das Pellet wurde in 250 µl des P1-Puffers resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Der P1-Puffer beinhaltet das *LyseBlue Reagent*, bei dem es sich um einen Farbindikator handelt, der eine visuelle Lysekontrolle ermöglicht. Zur Lyse der Zellen wurden anschließend 250 µl P2-Puffer zu der Probe hinzugegeben und das Reaktionsgefäß leicht geschwenkt bis sich die Lösung, aufgrund des *LyseBlue Reagent*, bläulich verfärbte. Die Zugabe von 350 µl des Neutralisations-Puffers und ein erneutes leichtes Schwenken bewirkten, dass das *LyseBlue Reagent* farblos wurde. Das Vorhandensein einer homogenen Lösung ohne blaue Spuren zeigt, dass der Lysepuffer effektiv neutralisiert wurde. Hinzu kommt die Bildung eines Präzipitates, bestehend aus Proteinen und genomischer DNA. Nach einer Zentrifugation von 10 Minuten bei 13000 x g wurde der Überstand in ein Reaktionsgefäß mit Silico-Säule pipettiert. Das gebildete Pellet wurde verworfen. Nach einer weiteren Zentrifugation von einer Minute bei 10000 x g lag die Plasmid-DNA an die Säule gebunden. Vor Entfernen des Durchflusses wurden 750 µl des Waschpuffers auf die Silico-Säule gegeben. Dies ermöglicht das Entfernen von Salzen und Proteinen. Es folgte eine erneute Zentrifugation für eine Minute bei 10000 x g. Ebenfalls wurde hier der Durchfluss aus dem Reaktionsgefäß entfernt. Eine Zentrifugation für eine Minute bei 12000 x g ohne Zugabe von Puffern ermöglichte, dass der gesamte Waschpuffer, insbesondere das darin enthaltene Ethanol, aus der Säule entfernt wurde. Die Säule wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 50 µl Elutionspuffer zentrifugiert. Die Zentrifugation erfolgte für eine Minute bei 10000 x g. Durch den Elutionspuffer gelangte die gewonnene Plasmid-DNA in das Reaktionsgefäß und die Silico-Säule konnte verworfen werden. Abschließend wurde die Konzentration der Plasmid-DNA unter Zuhilfenahme des NanoDrop™ 2000c photospektrometrisch gemessen und die DNA bei 4°C gelagert. Für die Langzeitlagerung wurden die Plasmide zusätzlich bei -20°C aufbewahrt.

### 3.3 Synthese von mRNA

#### 3.3.1 PCR zur Gewinnung von DNA-Inserts zur *in vitro* Transkription

Für die Generierung von *in vitro* Transkriptions-Templates (siehe Kapitel 3.3.2) wurde eine PCR mittels der Platinum Taq-Polymerase durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine DNA-abhängige DNA-Polymerase ohne *proofreading* Funktion. Die RT wurde wie unter Kapitel 3.1.2 durchgeführt.

Die bei der PCR verwendeten spezifischen Primer entsprachen die der RT. Es wurde ebenfalls ein Volumen von jeweils 0,5 µl verwendet. Das Volumen an dNTPs entsprach 0,5 µl. und das des DEPC-H<sub>2</sub>O entsprach 14,35 µl. Des Weiteren wurden 2,0 µl des 10x PCR Rxn Puffers ohne MgCl<sub>2</sub>, 1,4 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,25 µl des Enzyms Platinum Taq-Polymerase (5 U/µl) und 0,5 µl unverdünnter cDNA hinzupipettiert. Als Negativkontrolle diente anstelle der cDNA das DEPC-H<sub>2</sub>O. Die PCR-Ansätze wurden in 0,2 ml Reaktionsgefäße angefertigt und durch Pipettieren durchmischt. Im Anschluss inkubierten die Reaktionsgefäße im Thermalcycler C1000<sup>TM</sup>. Das Programm zur PCR kann der Tabelle 12 entnommen werden. Bei der Platinum Taq-Polymerase handelt es sich um ein Enzym ohne *proofreading*-Aktivität, d.h. sie führt während der PCR keine Korrekturmaßnahmen durch. Dadurch können Replikationsfehler auftreten.

**Tabelle 12:** Programm der PCR.

| Phase                  | T [°C] | t [sek] | Zyklen |
|------------------------|--------|---------|--------|
| Initiale Denaturierung | 95     | 180     | -      |
| Denaturierung          | 95     | 30      |        |
| Annealing              | 55     | 30      | 30     |
| Elongation             | 72     | 60      |        |
| Finale Elongation      | 72     | 180     | -      |

Die initiale Denaturierung zur Generierung von *in vitro* Transkriptions-Templates begann bei 95°C für 3 min. Hierbei kam es zur Trennung der beiden Template-DNA-Stränge. Das Annealing fand bei einer Temperatur von 55°C statt. Hier kommt es zu einer Hybridisierung der Oligonukleotidprimer an die einzelsträngige DNA. Anschließend wurde die Temperatur auf 72°C erhöht was zur Folge hatte, dass die Primer verlängert wurden und so erneut eine doppelsträngige DNA vorliegen konnte, die der ursprünglichen Template-DNA exakt glich. Da die Komplementierung an beiden Strängen der DNA abläuft, wurde in jedem Zyklus die Template-DNA verdoppelt. In der vorliegenden Arbeit wurden bei der PCR stets 30 Zyklen durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden schließlich gereinigt (siehe Kapitel 3.1.7) und bis zum zeitnahen Gebrauch bei 4°C gelagert.

### 3.3.2 *In vitro* Transkription

Die *in vitro* Transkription diente der Umschreibung von DNA in mRNA. Hierbei wurde auf das TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit zurückgegriffen.

Zur Erhöhung der Gesamtausbeute der Reaktion, welche durch einen verkürzten T7-Promotor verringert war, wurde jedes Gen im Duplikat transkribiert. Hierbei wurden 4 µl 5x TranscriptAid Reaction Puffer, 8 µl NTP Mix, welcher aus ATP, CTP, GTP und UTP bestand, 6 µl PCR-Produkt mit insgesamt etwa 300 ng DNA sowie 2 µl des TranscriptAid Enzyme Mix gemischt. Nach einer dreistündigen Inkubation bei 37°C, bei der die DNA-Matrize in RNA umgeschrieben wurde, führte eine Zugabe von 1 µl DNase I zum Verdau der Template-DNA bei 37°C für 30 min. Im Anschluss wurde die RNA mittels GeneJET RNA Purification Kit nach Angaben des Herstellers gereinigt (siehe Kapitel 3.1.1) und die Konzentration der RNA mittels NanoDrop bestimmt.

Im Anschluss an die *in vitro* Transkription wurde eine Capping-Reaktion mittels T7 mScript Standard mRNA Kit vorgenommen. Die RNA-Moleküle erhielten hierbei am 5'-Terminus eine Cap 1-Struktur. Je Ansatz wurden 60 µg RNA mit nukleasefreiem Wasser auf 72 µl aufgefüllt. Die verdünnte RNA wurde im Anschluss für 7 min bei 65°C erhitzt und zügig auf Eis überführt. Während der Inkubationszeit auf Eis wurden 10 µl 10x ScriptCap Capping Puffer, 2,5 µl 20 mM GTP, 2,5 µl 20 mM S-Adenosylmethionin, 2,5 µl ScriptGuard RNase Inhibitor, 4 µl ScriptCap 2'-O-Methyltransferase (100 U/µl) sowie 4 µl des ScriptCap Capping Enzyms (10 U/µl) gemischt. Nach der Fertigstellung des Enzym-Mix wurde die verdünnte RNA hinzugefügt und es folgte eine Inkubation für 30 min bei 37°C. Die Polyadenylierung der mRNA erfolgte zusätzlich durch das Mischen von 12 µl 10x A-Plus Tailing Puffer, 0,5 µl ScriptGuard RNase Inhibitor, 6 µl 20 mM ATP sowie 5 µl A-Plus poly(A) Polymerase (4 U/µl) mit der gecappten RNA. Nach der Inkubation bei 37°C für 30 min waren die synthetischen RNAs nun mit der viralen mRNAs identisch. Mittels des GeneJET RNA Purification Kits wurde die mRNA gereinigt (siehe Kapitel 3.1.1) und die Konzentration unter Zuhilfenahme des NanoDrops bestimmt. Nach Ermittlung der Konzentration wurde die mRNA aliquotiert und bei -80°C gelagert. Durch die Auftrennung und Visualisierung auf einem Agarosegel, welches in Kapitel 3.3.3 beschrieben wurde, konnte abschließend die Integrität jeder mRNA überprüft werden.

### **3.3.3 Agarose-Gelelektrophorese zur Visualisierung von RNA**

Die Agarose-Gelelektrophorese zur Visualisierung von RNA ähnelt der Durchführung unter Kapitel 3.1.5. Ausnahmen betreffen die Reinheit der verwendeten Materialien. Der verwendete Gelschlitten sowie der eingesetzte Kamm wurden vor dessen Verwendung mit RNase-Reagenz gereinigt. Bei der Agarose handelte es sich um eine aus der Originalverpackung frisch entnommene. Der Erlenmeyerkolben wurde ebenfalls sorgfältig vor dessen Verwendung gereinigt. Mittels der durch den NanoDrop gemessenen RNA-Konzentration wurde die Menge ausgemacht mit der diese und der 6x DNA Loading Dye in die Taschen des Gels pipettiert wurden.

## **3.4 Eukaryotische Zellkultur**

### **3.4.1 Kultivierung**

Die Kultivierung der adhärent wachsenden Zelllinien BSR-T7, MA-104 und ST erfolgte in einer 25 cm<sup>2</sup> oder einer 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37°C, einer Luftfeuchtigkeit von 90 % und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 %. Das Wachstumsmedium bestand aus High Glukose DMEM, Glutamax und 10 % FKS.

### **3.4.2 Passagieren**

Das Passagieren der Zellen erfolgte in wenigen Schritten und stets unter sterilen Bedingungen. Der erste Schritt war die Entnahme des alten Mediums aus der T-Flasche. Daraufhin wurde die Zellkulturflasche mit 1x PBS gewaschen. Dies hatte zur Folge, dass noch vorhandenes FKS ausgespült wurde. Andernfalls würde das FKS das im nächsten Schritt zuzuführende Trypsin inhibieren, d.h. die Zellen könnten sich nicht vom Boden der Zellkulturflasche lösen. Nachdem die Zellen gewaschen und 0,05 % Trypsin/EDTA hinzugeführt wurde, inkubierten die Zellen für wenige Minuten (etwa 10 min bis 15 min) im Brutschrank bei 37°C, einer Luftfeuchtigkeit von 90 % und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 %. Nach der Inkubation wurde Wachstumsmedium in die Zellkulturflasche pipettiert mit anschließender Vereinzelnung der Zellen durch Auf- und Abpipettieren der Zellsuspension. Es folgte schließlich eine Verdünnung, abhängig von der Konfluenz der Zellen (splitten der Zellen bei einer optischen Konfluenz von etwa 90 % bis 100 %). Die Zellen wurden schließlich im Brutschrank zur weiteren Kultivierung inkubiert. Die bei der Verdünnung



übriggebliebene Zellsuspension wurde verworfen oder für andere Analysen, wie z. B. der Zellzählung oder den Mykoplasmentest verwendet.

### 3.4.3 Zellzählung

Wie in dem vorherigen Kapitel 3.4.2 bereits erwähnt, wurde die bei der Verdünnung übriggebliebene Zellsuspension unter anderem für die Zellzählung verwendet. Die Zellzählung erfolgte unter Zuhilfenahme der Neubauer-Zählkammer und dient der Erfassung des optimalen Zellwachstums und der Zellzahl. Die Erfassung dieser Parameter ist unabdingbar, da für die Transfektion eine bestimmte Konfluenz erforderlich ist. Hierfür wurde die Neubauer-Zählkammer und ein Deckglas mit 70 %igen Ethanol gereinigt. Im Anschluss wurde das Deckglas unter leichtem Druck auf die Neubauer-Zählkammer geschoben. Nachdem die sogenannten Newtonschen Ringe zu sehen waren, konnte die Zellzählung begonnen werden.

Die Vorbereitung der Probe begann mit der Entnahme von 50 µl Zellsuspension unter sterilen Bedingungen. Diese wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 0,4 %igem Trypanblau im Verhältnis von 1:2 verdünnt. Vor der Benutzung des Trypanblau wurde dieses für eine Minute bei 8000 x g zentrifugiert, da es in der Stocklösung zur Bildung von Aggregaten kommen kann. Nach der Verdünnung der Zellsuspension mit Trypanblau wurden wenige Mikroliter seitlich in den Hohlraum zwischen Deckglas und Neubauer-Zählkammer pipettiert. Durch Kapillarkräfte gelangte die gesamte Suspension in den Hohlraum. Im Anschluss wurde die Zählkammer unter das Lichtmikroskop platziert. Nach und nach wurden alle Zellen innerhalb der vier Eckquadrate, welche in 4 x 4 kleinere Quadrate unterteilt sind, gezählt. Zu beachten ist hierbei, dass Zellen auf der oberen sowie linken Außenseite des Großquadrates mitgezählt wurden. Die Gesamtzellzahl pro Milliliter ergab sich aus der nachfolgenden Formel.

$$\frac{\text{Anzahl der Gesamtzellen} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Anzahl der gezählten Großquadrate}} \cdot 10^4 = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}}$$

### 3.4.4 Mykoplasmentest

Der Mykoplasmentest wurde angewandt, um die kultivierten Zelllinien auf Mykoplasmen zu testen. Bei Mykoplasmen handelt es sich um Bakterien, die unter aeroben bis fakultativ anaeroben Verhältnissen leben und eine Kontamination für die Zelllinien darstellen. Sobald

eine Kontamination vorliegt, ist eine Behandlung der eukaryotischen Zellen schwer. Aufgrund ihrer Größe von 0,2 µl bis 2 µl lässt sich eine Sterilfiltration nicht durchführen, da die Mykoplasmen den Filter passieren können. Mögliche Lösungen sind die Zugabe von Antibiotika und das Verwerfen der Kultur. Ein Grund für das Entfernen von Mykoplasmen ist das Eingreifen in den Stoffwechsel der befallenen Zellen. Dies kann zu Fehlinterpretationen von Versuchsergebnissen führen. Aufgrund der hohen Anzahl von Arginin-Vertretern unter den Mykoplasmen, welches anstelle von Glukose zur ATP-Gewinnung dient, leiden infizierte Zellkulturen unter sehr starken Argininmangel. Dieser wiederum beeinflusst die Histonsynthese was zu cytogenetischen Effekten und Chromosomenaberrationen führt. Es konnte ebenfalls beobachtet werden, dass Mykoplasmen Einfluss auf die Transfektionseffizienz haben. Da die Transfektion Teil dieser Arbeit ist, musste eine mögliche Kontamination vermieden werden.

Der Nachweis von Mykoplasmen wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie vorgenommen, da eine Erkennung der Kontamination unter dem Lichtmikroskop nicht möglich ist und es zu keiner Trübung des Mediums kommt. Die trypsinisierten Zellen wurden in eine Wellplatte mit frischem Wachstumsmedium ausplattiert und inkubierten bei einer Temperatur von 37°C im Brutschrank. Nach Erreichen der gewünschten Konfluenz wurde das Wachstumsmedium entfernt und die Kavitäten zweimal mit 1x PBS gewaschen. Die Fixierung sowie Färbung erfolgten in einem Schritt. Dabei wurde 80 % Aceton mit 0,5 µg/ml DAPI versetzt und anschließend auf die Zellen gegeben. Es folgte eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen und schließlich, um nicht auszutrocknen, erneut mit 1x PBS bedeckt. Die Zellen konnten nachfolgend unter dem Fluoreszenzmikroskop auf eine mögliche Kontamination von Mykoplasmen untersucht werden.

### **3.4.5 Infektion mit porzinen Rotaviren**

Für die Infektion wurden stets Zellen der Zelllinie MA-104 oder ST verwendet.

Vor der eigentlichen Infektion mussten die Zellen analog dem unter 3.4.2 beschriebenen Protokoll gesplittet und auf einer Wellplatte ausplattiert werden und solange inkubiert werden bis eine optische Konfluenz von 100 % vorlag. Nach dem Erreichen der gewünschten Konfluenz wurde das Wachstumsmedium entnommen und die Zellen wurden mit 1x PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von Infektionsmedium, dessen

Trypsinkonzentration je nach Zelllinie variierte. Es wurden Konzentrationen von 2 µg/ml bis 10 µg/ml eingesetzt. Während für die Positivkontrolle das Infektionsmedium mit Rotavirus (Stamm OSU oder AMC-1) infiziert und auf die Zellen gegeben wurde, wurde den Negativkontrollen (MOCK) nur Infektionsmedium hinzugegeben. Die MA-104-Zellen dienten der Vermehrung des RVA-Virus, welche mittels OSU-Stamm infiziert wurden. Für den AMC-1-Stamm, welcher zu RVC gehört, wurden zur Infektion die ST-Zellen verwendet, da diese permissiv sind. Nach der Infektion inkubierten die Zellen für eine bis eineinhalb Stunden bei 37°C, einer Luftfeuchte von 90 % und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt im Brutschrank. Anschließend wurde das Medium entnommen, die Zellen mit 1x PBS gewaschen und frisches Infektionsmedium hinzugegeben. Die Zellen inkubierten schließlich bei 37°C, einer Luftfeuchtigkeit von 90 % und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % im Brutschrank bis ein zytopathischer Effekt zu erkennen war. Dieser trat meist nach 20 h ein. Die infizierten Zellen konnten anschließend zum Nachweis Rotavirus-spezifischer Antikörper mittels Immunfluoreszenz-Test genutzt werden.

### 3.4.6 Transfektion

Mittels der Transfektion konnte die unter Punkt 3.2.1 gewonnene Plasmid-DNA oder die unter Kapitel 3.3.2 synthetisierte mRNA in Eukaryoten überführt werden. Als Maß der Effizienz, mit der das Genmaterial in die Zellen eingebracht wurde, erfolgte eine parallele Transfektion mit dem Gen des *Green Fluorescent Protein* (GFP), einem autofluoreszierenden Protein der Tiefseequalle *Aequorea victoria*.

Für die Transfektion wurden drei verschiedene auf kationischen Liposomen basierende Reagenzien verwendet. Die Einbindung von mRNA erfolgte mittels TransIT® -mRNA Transfection Kit. Die im 96-Wellformat oder auf *Chamber Slides* ausplattierten MA-104- oder BSR-T7-Zellen mussten vor der Transfektion eine optische Konfluenz von über 80 % aufweisen. Nachdem die gewünschte Konfluenz erreicht war, wurde das verstoffwechselte Wachstumsmedium entfernt und 90 µl frisches Wachstumsmedium in jede Kavität pipettiert. In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden das Transfektionsreagenz mit der gewünschten mRNA vorbereitet. Dabei wurden pro Kavität 90 ng der mRNA, 9 µl serumfreies DMEM-Medium, 0,18 µl des im Kit enthaltenen mRNA Boost Reagenz und 0,18 µl des ebenfalls im Kit enthaltenen TransIT-mRNA Reagenz zusammengeführt. Die Lösung wurde langsam durch Pipettieren gemischt. Im Anschluss erfolgte eine 2-minütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation wurden 10 µl der Transfektionslösung tropfenweise in

das Well pipettiert. Nach vorsichtigem Schwenken der Chamber Slide oder 96-Wellplatte folgte eine Inkubation bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt und einer 90 %igen Luftfeuchtigkeit für 12 bis 48 h im Brutschrank.

Die Transfektion von Plasmid-DNA erfolgte mittels TurboFect™ Transfection Reagent. Die optische Konfluenz der zu transfizierenden BSR-T7-Zellen betrug 70 - 90 %. Hierbei wurden sowohl 24- als auch 96-Wellplatten verwendet. Für die Transfektion in einer 96-Wellplatte wurden 100 µl serumfreies DMEM-Medium in den Kavitäten vorgelegt. In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden das Transfektionsreagenz mit der gewünschten Plasmid-DNA vorbereitet. Dabei wurden pro Well 0,2 µg der Plasmid-DNA und 20 µl serumfreies DMEM-Medium gemischt. Anschließend wurden 0,4 µl des Transfektionsreagenz zu der verdünnten Plasmid-DNA hinzugegeben. Es folgte eine langsame Durchmischung mit Hilfe der Pipette und eine Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation wurden 20 µl der Transfektionsreagenz/DNA-Lösung tropfenweise in das Well pipettiert. Es folgte ein Schwenken der Platte, damit sich die Lösung mit dem serumfreien DMEM-Medium mischt. Abschließend erfolgte eine Inkubation der Zellen im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt und einer 90 %igen Luftfeuchtigkeit für 24 bis 48 h. Für die Transfektion im 24-Wellformat wurden die verwendeten Volumina und Mengen pro Kavität mit dem Faktor 5 multipliziert.

Für die Transfektion von Plasmid-DNA wurde ebenfalls das Reagens Metafectene® Pro verwendet. Die optische Konfluenz für die zu transfizierenden BSR-T7-Zellen betrug 90 bis 100 %. Für die Transfektion wurde eine 96-Wellplatte verwendet, in der 100 µl Wachstumsmedium vorgelegt wurden. In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden für eine Kavität 50 ng der Plasmid-DNA in 15 µl serumfreies Medium (DMEM + GlutaMax) pipettiert. In einem weiteren 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 0,5 µl des Transfektionsreagenz in 40 µl serumfreies Medium pipettiert. Beide Lösungen wurden vorsichtig durch einmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt und anschließend zusammengeführt. Zu beachten war, dass die verdünnte Plasmid-DNA zu dem verdünnten Transfektionsreagenz pipettiert wurde. Nach dem Vereinigen beider Lösungen wurde ebenfalls einmalig vorsichtig Auf- und Abpipettiert, da der DNA-Lipid-Komplex durch zu starke Scherkräfte zerstört werden kann. Der Komplex inkubierte für 15 min bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation wurde der DNA-Lipid-Komplex schnell tropfenweise auf die Zellen pipettiert. Im Anschluss wurde durch vorsichtiges Schwenken der Zellkulturplatte der Komplex mit dem Wachstumsmedium gemischt. Es folgte eine Inkubation bei 37°C für 24 bis 72 h in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator.

### 3.4.7 Indirekter Immunfluoreszenz-Test

Bei dem Immunfluoreszenz-Test (IFA) werden Antikörper, die ungekoppelt oder mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert sind, zum Nachweis von Antigenen verwendet.

Die transfizierten (siehe Punkt 3.4.6) oder infizierten (siehe Kapitel 3.4.5) Zellen mussten vor dem eigentlichen Immunfluoreszenz-Assay auf der Wellplatte fixiert werden. Dies gelang, indem das Medium aus den Kavitäten entnommen und die Zellen mit 1x PBS gewaschen wurden. Im Anschluss wurde 80 % Aceton in die Wells pipettiert. Dieses inkubierte bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für 10 bis 20 min auf den Zellen. Nach der Inkubation wurde das Aceton entnommen und die Zellen erneut mit 1x PBS gewaschen.

Das 1x PBS wurde nachfolgend aus den Wells entnommen und es schloss sich ein Blockierungsschritt an. Dabei wurden 5 % BSA in 1x PBS auf die Zellen pipettiert. Der Blockingpuffer inkubierte bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 30 min auf den Zellen. Im Anschluss wurde der Puffer aus den Kavitäten entfernt und es folgte die Zugabe des primären Antikörpers. Dieser wurde in 5 % BSA in 1x PBS verdünnt und schließlich auf die Zellen pipettiert. Die Inkubation des primären Antikörpers erfolgte für eine Stunde bei  $37^{\circ}\text{C}$  und einem  $\text{CO}_2$ -Gehalt von 5 %. Mithilfe von 1 % BSA in 1x PBS wurden die Zellen anschließend dreimal gewaschen, so dass nur gebundene Antikörper verbleiben. Im nächsten Schritt wurde der sekundäre Antikörper auf die Zellen gegeben. Dieser wurde, analog des primären Antikörpers mit 5 % BSA in 1x PBS verdünnt. Nach der Inkubation des sekundären Antikörpers bei einer Temperatur von  $37^{\circ}\text{C}$  und einem  $\text{CO}_2$ -Gehalt von 5 % für eine Stunde wurde dieser aus den Kavitäten entnommen und es folgte erneut ein dreimaliger Waschschrift mit 1 % BSA in 1x PBS. Schließlich wurde der Fluoreszenzfarbstoff DAPI mit einer Endkonzentration von  $0,5 \mu\text{l/ml}$  in die Wells pipettiert. Nach einer Inkubation von 10 Minuten bei Raumtemperatur und unter Lichtsausschluss konnten die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop IX70 betrachtet werden. Es handelte sich hierbei um das indirekte Immunfluoreszenz-Verfahren.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Generierung rekombinanter Plasmid-DNA

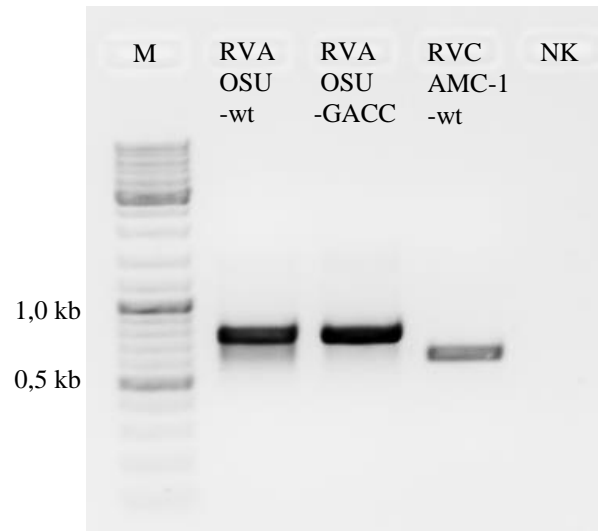
Zu Beginn der Arbeit wurden Primer für die Vervielfältigung des Gensegments 10 der Rotavirusgruppen A und C entworfen. Hierfür wurden der Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) virale porcine Sequenzen entnommen und daraus Sequenzalignments angefertigt. Aus den Alignments wurde ersichtlich, dass das für NSP4 kodierende Gensegment der Gruppe A 750 bp und das Gen der Gruppe C 613 bp besitzt. Mit Hilfe der generierten Primer konnte das Gensegment 10 der porcinen Rotavirusstämme OSU und AMC-1 in der RT-PCR vervielfältigt werden, um es schließlich mittels des Vektorsystems pJET1.2/Blunt zu klonieren. Die Vervielfältigung der Plasmid-DNA erfolgte schließlich durch die Transformation in chemisch kompetente *E.coli* XL10-GOLD-Zellen.

#### 4.1.1 Gewinnung von PCR-Fragmenten

Die Amplifikation des gewünschten Gensegments 10 der beiden wildtypischen Stämme von RVA und RVC erfolgte aus isolierter Total-RNA, welche aus RV-positivem Zellkulturüberstand gewonnen wurde, mittels RT-PCR unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide (siehe Tabelle 6). Die Oligonukleotide waren dabei so gewählt, dass sie an den 5'-Enden und 3'-Enden des Zielgens binden konnten und damit das vollständige Gensegment 10 vervielfältigt wurde. Nach der Amplifikation mittels RT-PCR erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung der erhaltenen PCR-Fragmente im Agarosegel. Die Ergebnisse der elektrophoretischen Auftrennung für das Gensegment 10 von RVA und RVC sind in der Abbildung 3 dargestellt.

Zusätzlich zu den durchgeführten RT-PCRs wurde eine mögliche Steigerung der Transfektionseffizienz bzw. der Proteinbiosynthese durch Deletion eines Teils der Konsensus-Sequenz in der UTR am 3'-Terminus des Gensegments 10 getestet. Da sich die Konsensus-Sequenz am 3'-Ende der Rotaviren befindet, wurde ein Reverse-Primer generiert, bei dem die letzten vier Nukleotide mit dem Motiv GACC deletiert vorlagen. Somit wurden für eine weitere RT-PCR die Primer T7RVA\_NS4s und RVANS4-GACCas, deren Sequenzen in der Tabelle 6 dargestellt sind, zur Vervielfältigung des Gens genutzt. Neben den RT-PCR-Produkten der wildtypischen Formen des zehnten Gensegments von RVA und RVC ist in der Abbildung 3 ebenfalls die GACC-deletierte Variante von RVA mittels Agarosegel visualisiert. Anhand der Negativkontrolle (NK), welche kein Amplifikat aufweist, kann das

Resultat der PCR als valide gewertet werden. Die resultierenden Fragmente entsprachen den theoretisch zu erwartenden Fragmentlängen der Gensegmente von 750 bp für RVA, 746 bp für die deletierte Form von RVA sowie 613 bp für RVC. Die erhaltenen PCR-Produkte waren dabei deutlich und abgegrenzt im Gel nachzuweisen und es zeigten sich keine Schmierbildung oder signifikante Fehlamplikate.

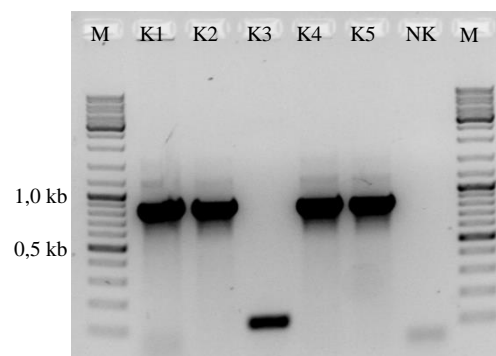


**Abbildung 3:** RT-PCR-Produkte des für das NSP4 kodierende Gensegments 10 der porcinen Rotavirusstämme OSU und AMC-1. Anhand des Größenstandards (M) sind die Größen der PCR-Produkte von RVA und RVC ersichtlich. Alle drei Fragmente entsprechen den theoretisch zu erwartenden Fragmentlängen von 750 bp, 746 bp bzw. 613 bp. Die Negativkontrolle (NK) ist negativ, daher ist das Ergebnis als valide zu deuten. Für die PCR wurde die Platinum Taq-Polymerase verwendet.

Aus den Gelbildern werden die in den Proben vorhandenen PCR-Fragmente ersichtlich, welche nach Erhalt analog zum Herstellerprotokoll der Reagenzsysteme von Proteinen und Salzen gereinigt wurden. Für die weitere Verwendung in nachfolgenden Experimenten kamen nur die PCR-Fragmente mit einer starken, gut abzugrenzenden Bande und damit einem ausreichend hohen DNA-Gehalt zum Einsatz. Zusätzlich mussten die Banden die erwarteten Sequenzlängen aufweisen und durften nur Abbauprodukte im geringen Maße aufweisen. Im Anschluss an die Isolation, wurden die Reinheiten und Konzentrationen der DNA photospektrometrisch bestimmt, um eine Kontamination mit Proteinen, Salzen oder Lösungsmitteln auszuschließen. Die Lagerung der intakten Amplifikate erfolgte bis zur weiteren Nutzung bei 4°C. Die Klonierung der PCR-Fragmente wurde anschließend mittels des Vektorsystems pJET1.2/Blunt vorgenommen.

#### 4.1.2 Nachweis der Insertion mittels Kolonie-PCR

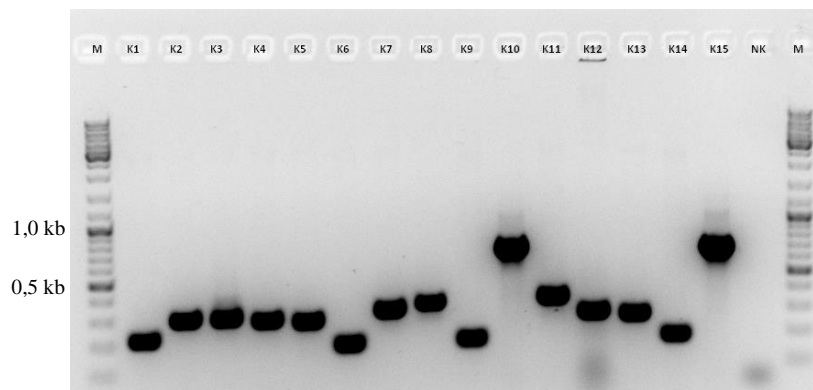
Für die Expression des Proteins NSP4 war es notwendig, die jeweiligen Gensegmente von RVA und RVC unter Zuhilfenahme des Vektorsystems pJET1.2/Blunt zu klonieren. Die Klonierung erfolgte dabei durch eine gezielte Ligation der NSP4-Sequenzen an den T7-Promoter des Plasmids. Nach der erfolgreichen Ligation der Genfragmente in das pJET1.2/Blunt-Vektorsystem erfolgte die Transformation der rekombinanten Plasmid-DNA in *E.coli* XL10-GOLD-Zellen. Mit dem Ausstreichen der Zellen konnte eine Vielzahl von *E.coli*-Transformanten gewonnen werden, die den Vektor pJET1.2/Blunt und damit eine Ampicillinresistenz aufwiesen. Der Nachweis der korrekten Insertion erfolgte mittels Kolonie-PCR unter Zuhilfenahme spezifischer Oligonukleotide. Diese waren so gewählt, dass sie auf dem Vektorrückgrat binden konnten und die klonierte Gensequenz flankierten. Nach der Gewinnung der Amplikons erfolgte eine elektrophoretische Trennung im Agarosegel. In der Abbildung 4 sind die Ergebnisse der Kolonie-PCR für NSP4 von RVA des OSU-Stammes exemplarisch veranschaulicht. Die resultierenden Fragmente in vier von fünf Kolonien wiesen eine Größe von 863 bp auf und entsprachen somit der erwarteten Fragmentlänge, die sich aus einem 113 bp langen Fragment der Plasmid-DNA und den 750 bp des NSP4-Gens ergaben. Bei der Kolonie 3 handelt es sich hingegen um einen Bakterienklon, bei dem das gewünschte Gen nicht ligiert worden ist, so dass während der PCR nur ein Fragment des Plasmids amplifiziert wurde.



**Abbildung 4:** Nachweis der Insertion des für NSP4 kodierenden Gensegments von RVA mittels Kolonie-PCR. Auf dem Agarosegel sind neben des Größenstandards (M) ebenfalls die Amplifikate der Kolonien 1 bis 5 (K1 bis K5) sowie die Negativkontrolle (NK) dargestellt. Bei der NK ist wie erwartet keine Bande ersichtlich. Dies bedeutet, dass das Ergebnis als real gewertet werden kann. Die Kolonien K1, K2, K4 und K5 besitzen das korrekte Plasmid mit dem gewünschten Zielgen. Für die Kolonie K3 konnte das erforderliche Fragment hingegen nicht nachgewiesen werden.



Das Ergebnis der Kolonie-PCR für die Insertion des Gensegments 10 des porzinen RVC-Stamms AMC-1 ist in der Abbildung 5 dargestellt. Von den zur Kolonie-PCR herangezogenen Klonen wiesen zwei von 15 die theoretisch zu erwartende Fragmentlänge mit einer Größe von 726 bp auf, welche sich ebenfalls aus dem 113 bp-Amplifikat des Plasmid-Rückgrates sowie den 613 bp des NSP4-Gens zusammensetzt. Bei den Kolonien ohne gewünschtem Insert handelt es sich vermutlich um Plasmide, bei denen zu kleine Abbau- oder Fehlampifikate eingebaut wurden.



**Abbildung 5:** Nachweis der Insertion von RVC mittels Kolonie-PCR. Auf dem Agarosegel sind neben den Größenstandards (M) ebenfalls die Kolonien 1 bis 15 (K1 bis K15) sowie die Negativkontrolle (NK) dargestellt. Aufgrund keiner vorhandenen Amplifikation bei der NK ist das Ergebnis als real zu werten. Die Kolonien K10 und K15 besitzen das gewünschte Plasmid mit vollständigem Insert. Alle restlichen Kolonien weisen einen Vektor mit fehlerhaften Insert auf.

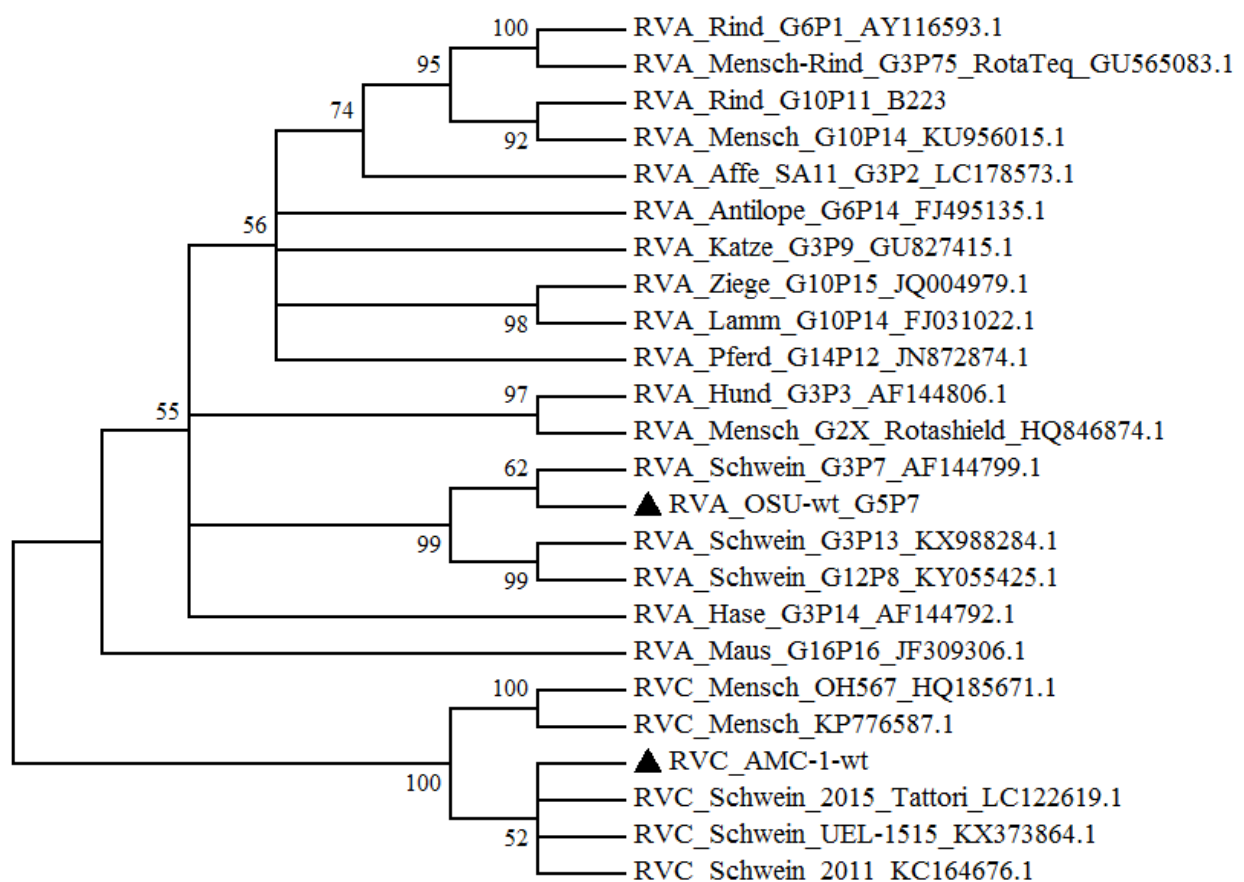
Aus den Gelbildern der Agarose-Gelelektrophorese sind die in den Proben enthaltenen DNA-Fragmente ersichtlich. Die Kolonien von RVA und RVC mit der richtigen Insertgröße wurden anschließend für nachfolgende Experimente verwendet. Im Anschluss erfolgte die Isolierung des Plasmids mittels Minipräparation, um die Plasmid-DNA zu gewinnen.

## 4.2 DNA-Sequenzierungen

Die Sequenzen der Plasmid-DNA wurden von der Firma Microsynth Seqlab bestimmt und dem Institut für Virologie zugesandt. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden nachfolgend mit Hilfe des Programms GENTle ausgewertet. So konnte sichergestellt werden, dass das gewünschte Insert in der richtigen Orientierung und ohne weitere Mutationen ligiert wurde. Darüber hinaus wurden auf diese Weise Sequenzen generiert, welche mit bekannten Rotavirus-Sequenzen aus der NCBI Datenbank bezüglich ihrer Homologie verglichen werden konnten.

#### 4.2.1 Sequenzabgleich mit bekannten Rotavirusstämmen

Mit Hilfe der bekannten Rotavirus-Sequenzen aus der Datenbank des NCBI und den in dieser Arbeit sequenzierten Genen, wurde ein phylogenetischer Baum für das Gensegment 10 (siehe Abbildung 6) erstellt. Hierzu wurden Rotavirus-Sequenzen unterschiedlicher Spezies sowie die Sequenzen der kommerziellen Vakzinen für den Menschen herangezogen. Durch die Berechnung eines Sequenzalignments des NSP4-Gens wurden Ähnlichkeiten und Unterschiede verwendet, um den Baum aufzubauen. Die Virusstämme, deren Sequenzen ähnlich sind und höhere Homologien aufweisen, liegen näher beieinander als solche, die signifikante Unterschiede aufweisen.

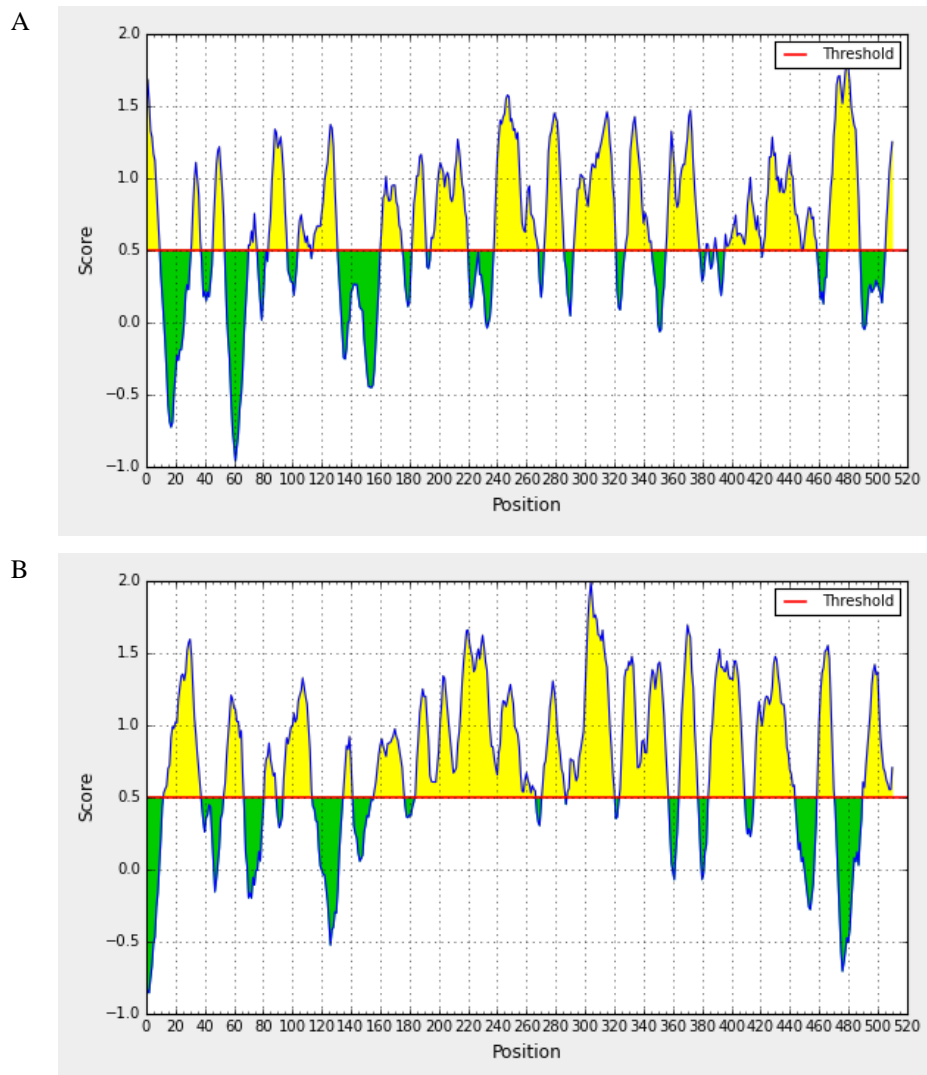


**Abbildung 6:** Phylogenetischer Baum für das Gensegment 10 bekannter Rotavirusstämmen. Die evolutionäre Verwandtschaft der Virusstämme wurde mittels der *Neighbor-Joining*-Methode bestimmt. Neben den Zweigen wird ebenfalls der Prozentsatz der Replikatbäume angezeigt, die Taxa mittels im *Bootsstrap*-Test mit 500 Replikaten zusammengefasst wurde. Für die Berechnung der evolutionären Distanzen wurde die *Maximum Composite Likelihood* Methode angewandt. Die Analyse umfasste 24 Nukleotidsequenzen. Alle Nukleotidpositionen mit Lücken und fehlenden Daten wurden eliminiert. Insgesamt gab es 612 Positionen im endgültigen Datensatz. Für die Analyse wurde das Programm „MEGA6“ verwendet. Bei den Rotavirusstämmen mit schwarzem Dreieck handelt es sich um die in dieser Arbeit genutzten Stämme. Zusätzlich wurden die Identifikationsnummern für alle in der NCBI Datenbank eingetragenen Sequenzen vermerkt.

In dem Stammbaum der Abbildung 6 sind die evolutionären Beziehungen der Rotavirusstämme unterschiedlicher Spezies dargestellt. Da die Berechnung von phylogenetischen Bäumen eine hohe Komplexität aufweist, werden verschiedene Heuristiken verwendet, welche die Bäume generieren. Die in dieser Arbeit verwendete Methode ist die im Jahre 1987 von Saitou und Nei vorgestellte *Neighbor-Joining*-Methode. Hierbei werden die Sequenzen an den Hauptästen anhand ihrer Homologie eingeordnet. Die in dieser Arbeit verwendeten Virusstämme, welche mit einem schwarzen Dreieck gekennzeichnet sind, gruppieren sich dabei erwartungsgemäß zu Isolaten, welche den gleichen Ursprung besitzen. Demnach findet sich der RVA-Stamm OSU geclustert mit porzinen Rotavirussequenzen der Gruppe A, während sich der RVC-Stamm AMC-1 zu weiteren RVC-Isolaten ordnen lässt.

#### 4.2.2 Bestimmung potentieller NSP4-Epitope

Zusätzlich zur Darstellung der evolutionären Verwandtschaft zwischen den Rotavirusstämmen wurde eine Vorhersage über die Immunogenität einzelner Peptide innerhalb des Zielproteins getroffen. Dazu wurde eine nach Larsen et al., 2006 entwickelte *Software* verwendet. Die Antigenität beruht hierbei auf der Polarität, Hydrophobizität und Tertiärstruktur des untersuchten Proteins bzw. dessen einzelnen Peptidketten. Die Bestimmung eines Gesamtwertes für das analysierte Peptid erfolgt durch einen empirisch ermittelten Wert der jeder Aminosäure zugrunde gelegt werden kann. Je höher der Gesamtwert ist und je deutlicher der Schwellenwert überschritten wird, umso höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass es sich um ein B-Zellepitop handelt, gegen das spezifische Antikörper gebildet werden. In der Abbildung 7 ist eine solche Vorhersage für NSP4 von RVA (A) und RVC (B) dargestellt. Die Abbildung veranschaulicht, dass sowohl RVA als auch RVC eine Vielzahl an potentiellen NSP4-Epitopen besitzen und damit höchstwahrscheinlich immunogen sind.



**Abbildung 7:** Schematische Darstellung potentieller NSP4-Epitope. In der Abbildung wird verdeutlicht, dass NSP4 sowohl von RVA [A] als auch von RVC [B] zahlreiche potentielle Epitope aufweist. Peptide, die den Schwellenwert von 0,5 überschreiten (gelb markiert), stellen mögliche B-Zellepitope dar. Bei den grün markierten Bereichen handelt es sich um Peptide ohne oder mit sehr geringen immunogenen Eigenschaften.

Die Anzahl der Peptide, der *Score*-Durchschnitt, das *Score*-Minimum sowie das *Score*-Maximum der potentiellen NSP4-Epitope sind in der Tabelle 13 jeweils für RVA und RVC dargestellt.

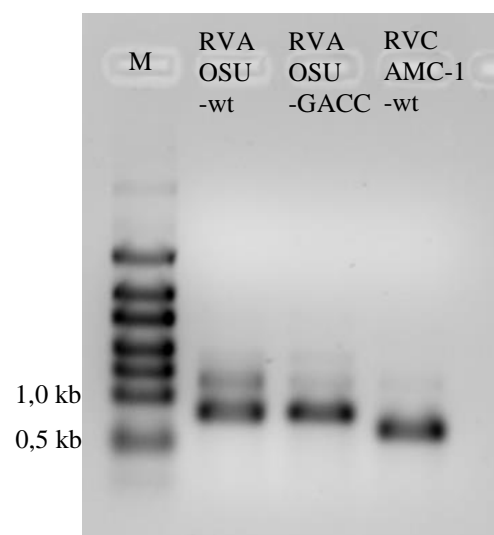
**Tabelle 13:** Immunogenität der Rotavirusstämme OSU und AMC-1.

| Rotavirus | Anzahl Peptide | Score        |         |         |
|-----------|----------------|--------------|---------|---------|
|           |                | Durchschnitt | Minimum | Maximum |
| RVA       | 21             | 0,654        | -0,964  | 1,797   |
| RVC       | 14             | 0,76         | -0,858  | 1,995   |

Es zeigt sich, dass RVC trotz geringerer Anzahl an Peptiden einen höheren *Score* besitzt. Dies stellt eine geringere Immunogenität von RVA dar als es bei RVC der Fall ist. Dennoch ist in beiden Fällen eine spezifische Induktion der Immunantwort wahrscheinlich.

### 4.3 Synthese artifizierter Rotavirus-mRNAs mittels *in vitro* Transkription

Nach der Gewinnung der PCR-Produkte wurden diese zur Synthese artifizierter mRNA mittels *in vitro* Transkription ausgehend vom Promotor der T7-RNA-Polymerase genutzt. Durch den Einsatz der T7-RNA-Polymerase wird eine Ausbeute von Ziel-mRNA mit hohen Konzentrationen erreicht. Die Durchführung erfolgte wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben. Nach Erhalt der mRNA, einschließlich der *Capping*-Reaktion und der Polyadenylierung erfolgte eine Agarose-Gelelektrophorese. In der Abbildung 8 ist das RNA-Agarosegel dargestellt, welches zur Überprüfung der mRNA-Integrität diente.



**Abbildung 8:** Agarose-Gelelektrophorese der mittels *in vitro* Transkription gewonnenen mRNA. Anhand des RNA-Größenstandards (M) können die Größen der mRNA-Fragmente abgelesen werden. Hierbei besitzen alle drei Fragmente die theoretisch zu erwartenden Fragmentlängen von 750 nt, 746 nt bzw. 613 nt.

Die resultierenden Fragmente nach der Auftrennung besaßen die theoretisch zu erwartenden Fragmentlängen von 750 nt für die wildtypische NSP4-mRNA von RVA, 746 nt für die GACC-deletierten mRNA sowie 613 nt für die NSP4-mRNA des wildtypischen RVC. Da bei allen mRNAs eine klar abgegrenzte Bande und keine Schmierbildung auftrat, konnte von einer hohen Integrität der mRNA ausgegangen werden. In allen Proben zeigten sich jedoch zusätzlich zur Ziel-mRNA deutlich längere Produkte, die aber in einer geringeren Menge synthetisiert wurden. Mittels der spektrophotometrischen Bestimmung von Konzentration und

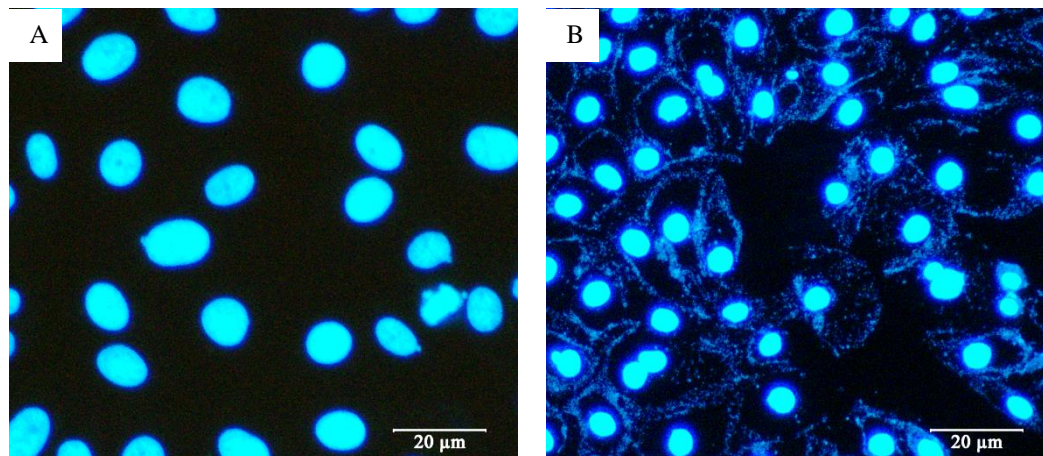
Reinheit konnte die Anwesenheit unerwünschter Proteine oder Kontaminationen mit organischen Verbindungen wie Ethanol ausgeschlossen werden. Für die weiteren Analysen wurde stets intakte mRNA mit hohen Reinheitswerten verwendet, welche bei Nichtgebrauch bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert wurde.

#### 4.4 Etablierung der Zellkultursysteme

Da die Generierung der zu transfizierenden Nukleinsäuren erfolgreich war, sollten nun für die Zellkultursysteme optimale Bedingungen sichergestellt werden. Dies beinhaltete neben einer kontaminationsfreien Zellkultur ebenfalls eine für die Transfektionsmedien optimale Zellzahl.

##### 4.4.1 Mykoplasmentest

Da während der Passagierung der Zellen keine Trübungen oder Verfärbungen des Wachstumsmediums auftraten, konnten makroskopisch stets Kontaminationen durch Bakterien und Pilze ausgeschlossen werden und es erfolgte in regelmäßigen Abständen ein Mykoplasmentest mittels Fluoreszenzmikroskopie. Zur Veranschaulichung eines Mykoplasmentest mittels DAPI-Färbung ist ein aussagekräftiges Resultat exemplarisch in der Abbildung 9 dargestellt.



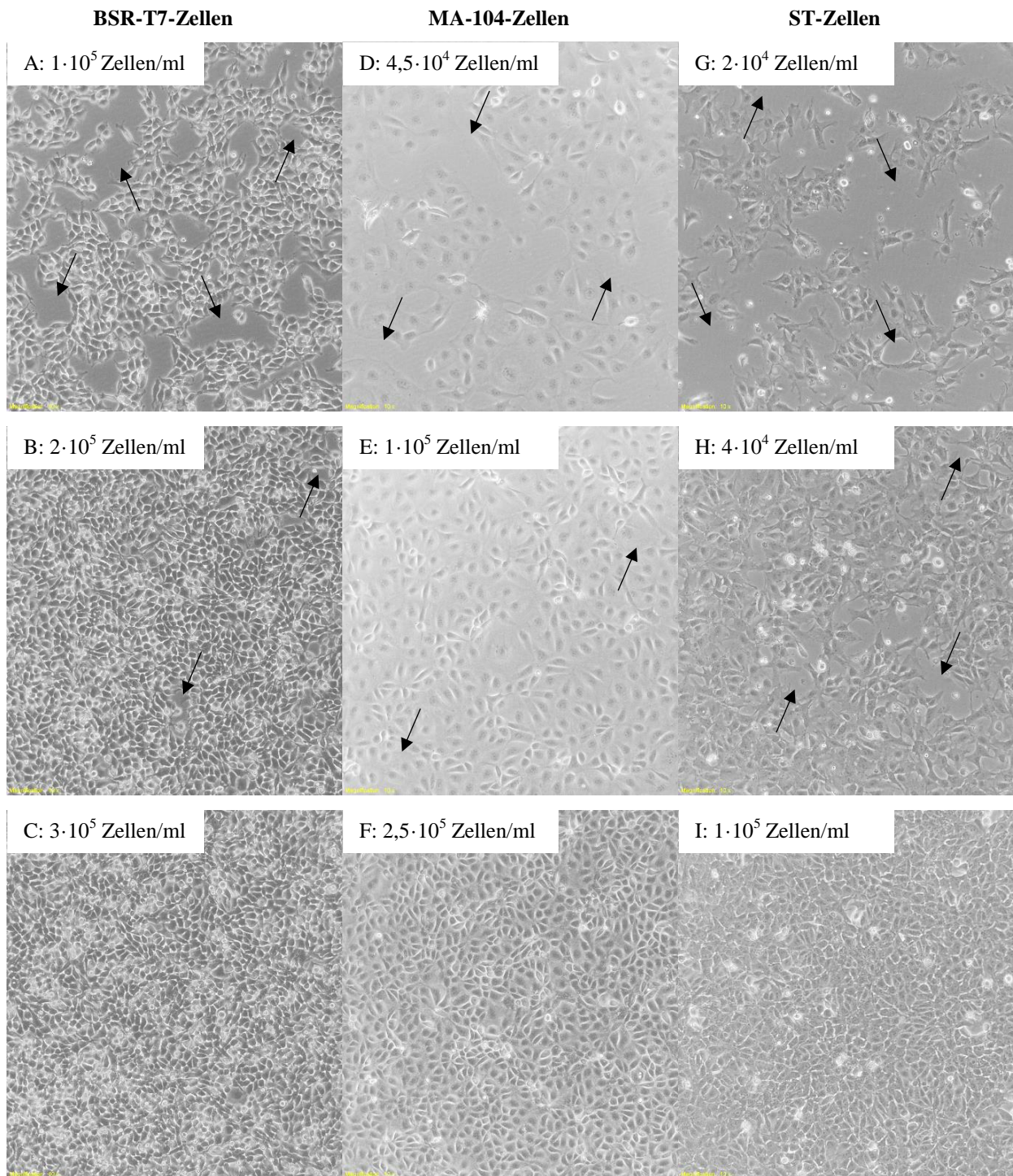
**Abbildung 9:** Gegenüberstellung eines negativen und positiven Mykoplasmentests im Fluoreszenzmikroskop. In der Abbildung sind kontaminationsfreie BSR-T7-Zellen [A] und mit Mykoplasmen kontaminierte Marc 30-Zellen [B] gegenübergestellt. Beide Zelllinien wurden mit DAPI gefärbt, was durch die blaue Färbung der Zellkerne zu erkennen ist. Neben den DAPI-gefärbten Zellkernen werden bei den Marc 30-Zellen zwischen den Zellen Schleier sichtbar. Bei diesen handelt es sich um eine Mykoplasmen-Kontamination.

In der Abbildung 9 werden auf Mykoplasmen positiv und negativ getestete Zelllinien dargestellt. Zur Veranschaulichung wird die in dieser Arbeit verwendete BSR-T7- und zu

diesem Zweck herangezogene Marc 30-Zelllinie gegenübergestellt. Beide Zelllinien wurden mit DAPI gefärbt, wobei es zu einer blauen Färbung von Nukleinsäuren und damit der Zellkerne kommt. Werden die beiden Abbildungen miteinander verglichen, sind neben den Zellkernen in Bild B ebenfalls Schleier zwischen den Nuclei zu erkennen. Hierbei handelt es sich um eine Mykoplasmen-Kontamination. In Bild A sind zusätzlich zu den Zellkernen keine weiteren DAPI gefärbten Strukturen zu erkennen. Daher können diese als kontaminationsfrei eingestuft werden. Der Mykoplasmentest wurde regelmäßig mit allen in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien durchgeführt. Die Zelllinien waren dabei stets kontaminationsfrei und konnten aus diesem Grund zur Optimierung der Zellzahl für die einzelnen Transfektionsreagenzien und alle serologischen Analysen herangezogen werden.

#### **4.4.2 Bestimmung optimaler Zellzahlen**

Mit Hilfe des Mykoplasmentests wurde eine kontaminationsfreie Umgebung der Zellen gewährleistet. Somit konnte nun die optimale Zellzahl der verschiedenen Zelllinien für die einzelnen Transfektionsreagenzien bzw. für die RV-Infektionen bestimmt werden. Zu Beginn wurde jedoch zunächst die Zellzahl ermittelt, bei der eine optische Konfluenz von 100 % vorlag. Während des Passagierens der Zellen wurde Zellsuspension zu diesem Zweck entnommen, die Anzahl der Gesamtzellen mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt und mit Hilfe der Formel aus Kapitel 3.4.3 die Gesamtzellzahl pro Milliliter berechnet. Dieser Vorgang erfolgte für alle Zelllinien. Aus der Gesamtzellzahl pro Milliliter wurden schließlich verschiedene Verdünnungsstufen mit unterschiedlichen Zellzahlen angefertigt, welche auf einer Wellplatte mit 96 Kavitäten ausgesät wurden. Nach einer festgelegten Inkubationszeit im Brutschrank wurde die Kavitätenplatte entnommen und die Zellen unter dem Lichtmikroskop bezüglich ihrer Konfluenz begutachtet. Die Abbildung 10 stellt die verschiedenen Zellzahlen dar, wobei sowohl die optische Konfluenz von 100 % als auch die optimale Zellzahl für die Transfektionsreagenzien ersichtlich sind. Es wird dabei deutlich, dass für die unterschiedlich großen Zelllinien in Abhängigkeit der nachfolgend anzuwendenden Methode auch verschiedene Zellzahlen ausplattiert werden müssen. Die für eine Transfektion optimale Zelldichte ist dabei in den Teilabbildungen 11 B, 11 E und 11 H dargestellt und durch eine ca. 80 %ige Konfluenz gekennzeichnet. Die Fläche, bei der der Zellrasen noch unterbrochen ist, kann hierbei deutlich im Durchlichtmikroskop ausgemacht werden. Im Gegensatz dazu, ist die optische Konfluenz von 100 %, die die optimale Zellzahl für die Infektion mit den RV-Stämmen AMC-1 bzw. OSU dargestellt, durch einen geschlossenen Zellrasen gekennzeichnet (siehe Teilabbildungen 11 C, 11 F und 11 I).



**Abbildung 10:** Optimale Zellzahlen der Zelllinien BSR-T7, MA-104 und ST. Die Bestimmung der optimalen Zellzahl der Zelllinie BSR-T7 erfolgte nach einer Inkubation von 28 h, die der MA-104 ebenfalls nach 28 h und die der ST-Zellen nach 20-stündiger Inkubation. Während die BSR-T7-Zellen bei einer geringen Zelldichte von  $1 \cdot 10^5$  Zellen/ml noch Platz für Wachstum besaßen (gekennzeichnet durch schwarze Pfeile), ist dieser bei einer optimalen Konfluenz für die Transfektion [B] bereits stark eingeschränkt. Erst beim Ausplattieren von  $3 \cdot 10^5$  Zellen/ml [C] ist eine optische Konfluenz von 100 % erreicht. Dies zeigte sich auch für die Kultur der MA-104- und ST-Zellen. So waren nach dem Ausplattieren einer sehr geringen Zellzahl [D, G] für beide Kulturen noch deutliche Zwischenräume zu erkennen und erst mit der Erhöhung der Zellzahlen wurden für die experimentellen Analysen optimale Zelldichten erreicht. Für die MA-104- sowie ST-Zellen werden die entsprechenden *Monolayer*, welche bei Infektions- bzw. Transfektionsversuchen benötigt wurden, aus den Teilabbildungen F und I sowie E und H ersichtlich.



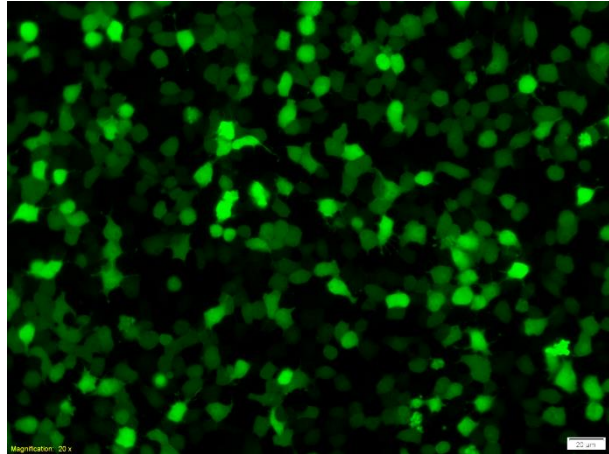
### 4.4.3 Optimierung der Transfektionsbedingungen

Die in dieser Arbeit genutzten Zellen müssen neben einer starken Permissivität für die Infektion mit Rotaviren auch eine hohe Transfektionseffizienz aufweisen. Letzteres ist sowohl von dem genutzten Transfektionsreagenz als auch von der Aufnahmefähigkeit der Zellen abhängig. Als vergleichsweise gut zu transfizierende Zellen haben sich die Zelllinien BSR-T7 und MA-104 herausgestellt. Da es zwischen den verschiedenen Zelllinien zu einer starken Variation bezüglich der optimalen Bedingungen für die Transfektion kommen kann, wurden unterschiedliche Transfektionssysteme auf ihre Effizienz getestet. Alle hierfür genutzten Reagenzsysteme beruhen auf der Bildung von Liposomen und wurden nach dem vom Hersteller angegebenen Standardprotokoll, zusammengefasst in der Tabelle 14, durchgeführt.

**Tabelle 14:** Standardprotokoll der Transfektionssysteme im 96-Kavitätenformat.

| Reagenz          | DNA/mRNA im Medium                             | Reagenz im Medium    | Inkubation | Medium gesamt |
|------------------|--|----------------------|------------|---------------|
| Metafectene® Pro | 100 ng in 30 µl DMEM                           | 0,5 µl in 40 µl DMEM | 15 min     | 150 µl        |
| TransIT®         | 90 ng in 45 µl DMEM                            | 2 µl direkt zur mRNA | 2 min      | 110 µl        |
| TurboFect        | 200 ng in 20 µl DMEM und 0,18 µl Boost Reagent | 2 µl direkt zur DNA  | 15-20 min  | 200 µl        |

Um den Erfolg der Transfektionen einfach und schnell beurteilen zu können, wurde eine für GFP kodierende Plasmid-DNA bzw. mRNA, welche bereits im Institut für Virologie der Veterinärmedizinischen Fakultät in Leipzig vorlagen, genutzt. Durch die grüne Eigenfluoreszenz des GFP lassen sich Zellen, die die Nukleinsäure erfolgreich aufgenommen haben, rasch und präzise ohne weitere Immunfärbung nachweisen. Die transfizierten Zellen wiesen allerdings starke strukturelle Veränderungen auf, welche sich auf die Größe oder die Bildung granulärer Einschlüsse auswirkten. Aus diesem Grund wurden verschiedene Verdünnungen der einzelnen Transfektionsreagenzien, angefertigt und die transiente GFP-Expression nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank ausgewertet. In der Abbildung 11 ist die positive Transfektion der BSR-T7-Zellen mit einer Effizienz von ungefähr 75 % gezeigt. Für die MA-104-Zellen wurden hingegen geringere Effizienzen von ca. 40 % erreicht. Eine verlängerte Inkubationszeit von 48 h führte dabei zu keinerlei Veränderungen in der Transfektionseffizienz, so dass alle nachfolgenden Analysen nach einer Inkubation von 24 h durchgeführt wurden.



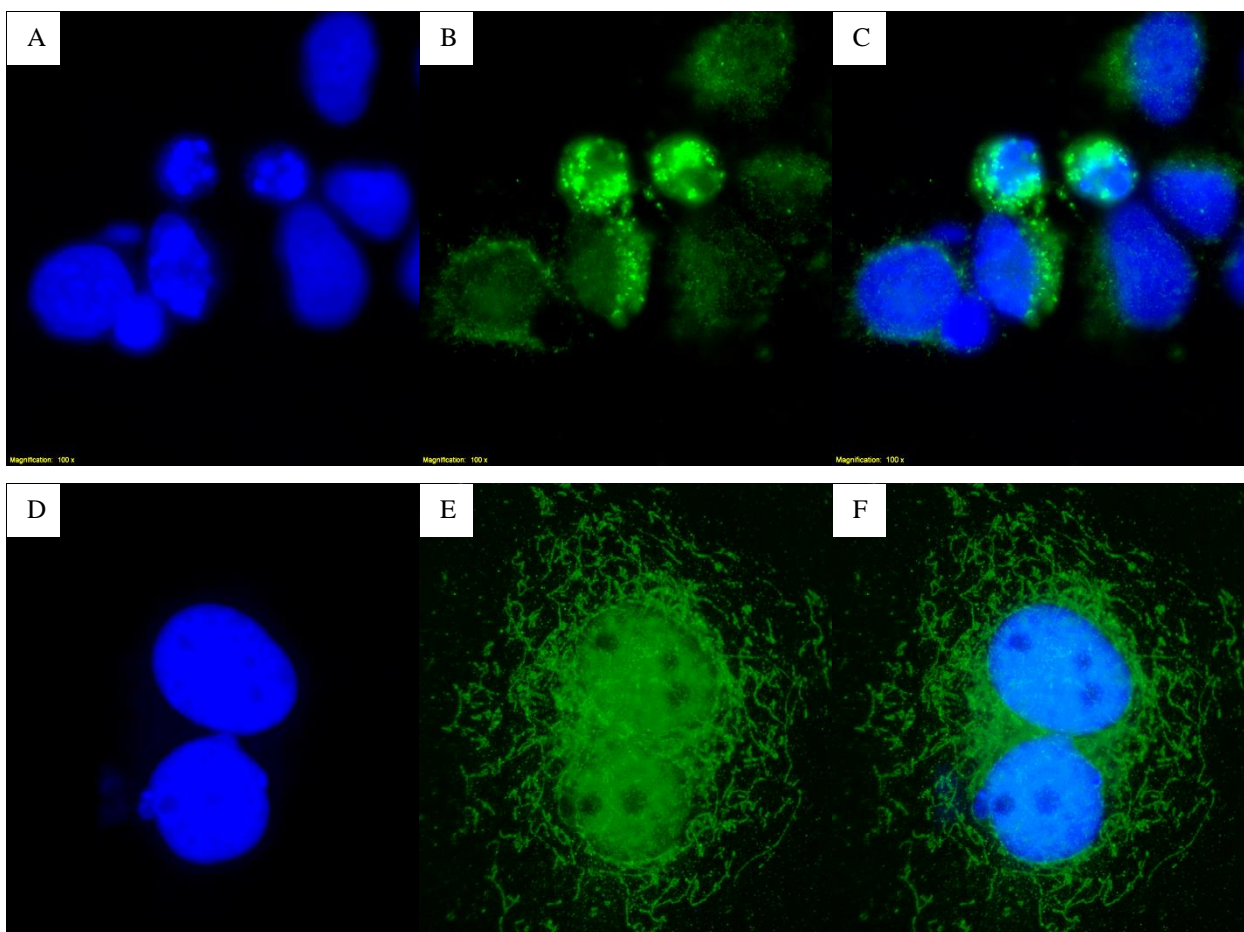
**Abbildung 11:** Transfektion von BSR-T7-Zellen mittels des Plasmids pTIT-GFP. Die grün fluoreszierenden Zellen stellen positiv transfizierte Zellen dar, bei denen die Plasmid-DNA erfolgreich aufgenommen wurde.

Neben den für Plasmid-DNA ausgelegten Transfektionsreagenzien wurde das TransIT® -mRNA Transfection Kit verwendet. Die Transfektion von mRNA ist zumeist durch eine höhere Effizienz gekennzeichnet, welche auf die geringeren Molekülgrößen der mRNA im Vergleich zur Plasmid-DNA zurückzuführen ist. Die Nutzung von TransIT® führte erwartungsgemäß auch zu einer gesteigerten Effizienz in den transfizierten MA-104-Zellen. Bei den BSR-T7-Zellen war hingegen das Gegenteil der Fall. Hier zeigte sich, wie schon beim Einsatz der Plasmid-DNA eine stark erhöhte Toxizität. Da sich das Transfektionsreagenz jedoch für das Einbringen von mRNA in die MA-104-Zellen am besten geeignet hat, wurden alle weiteren Versuche mit dem TransIT® -mRNA Transfection Kit und jener Zelllinie durchgeführt.

#### **4.5 Funktionalität der Rotavirus-mRNAs und Nachweis der Proteinexpression**

Nach der Gewinnung der für NSP4 kodierenden mRNA mittels *in vitro* Transkription sollte diese auf ihre Funktionalität getestet werden. Aus diesem Grund erfolgte eine Transfektion von MA-104-Zellen mit der artifiziellen mRNA unter Zuhilfenahme des TransIT®-Reagenz. Der im Anschluss durchgeführte IFA gab durch die Erfassung der Proteinexpression schließlich indirekt Auskunft über die Funktionalität der mRNA. Als primärer Antikörper zur Markierung diente hierbei ein unkonjugierter polyklonaler anti-RVA NSP4-Antikörper, welcher durch die Immunisierung von Kaninchen gewonnen wurde. Dass nach der Transfektion der artifiziellen mRNA des Gensegments 10 eine Expression von NSP4 vorlag,

geht aus der Abbildung 12 hervor. Dabei zeigten die mit der NSP4-mRNA transfizierten Zellen zwar eine hohe Zytotoxizität, darüber hinaus konnte im Zytoplasma jedoch ein starkes spezifisches Fluoreszenzsignal nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu war das in den mit einer NSP3-mRNA transfizierten Kontrollzellen auftretende Hintergrundsignal vergleichsweise schwach und die angefärbten Strukturen unterschieden sich bezüglich ihrer Lokalisation in signifikanter Weise vom spezifischen NSP4-Signal. Die Transfektion der NSP4-mRNA führte damit zur Translation eines intakten Proteins, so dass die transfizierten Zellen für den Nachweis spezifischer anti-NSP4-Antikörper eingesetzt werden konnten.



**Abbildung 12:** Nachweis der Funktionalität von transfizierter NSP4-mRNA. Für die Transfektion der mRNA wurden MA-104-Zellen genutzt. Der IFA erfolgte mit Hilfe des primären ungekoppelten polyklonalen anti-RVA NSP4-Antikörpers und des sekundären Alexa Fluor<sup>TM</sup> 488 goat anti-rabbit-Antikörpers. Letzterem wurde DAPI zugegeben, was zu einer blauen Färbung der Zellkerne [A, D] führte. Um eine unspezifische Färbung zellulärer Proteine ausschließen zu können, wurde eine Negativkontrolle [D, E, F] mitgeführt. Hierbei handelte es sich um Zellen, die mit einer für NSP3 kodierenden mRNA transfiziert wurden. Der sekundäre Antikörper ist mit einem cyan-grünen Farbstoff gekoppelt, bindet als Spezies-Antikörper an den primären Antikörper und somit indirekt an das in den Zellen exprimierte NSP4 [B]. Durch den *Overlay* der mikroskopischen Aufnahmen [C, F] kann die Lokalisation von NSP4 im Zytoplasma gezeigt werden.

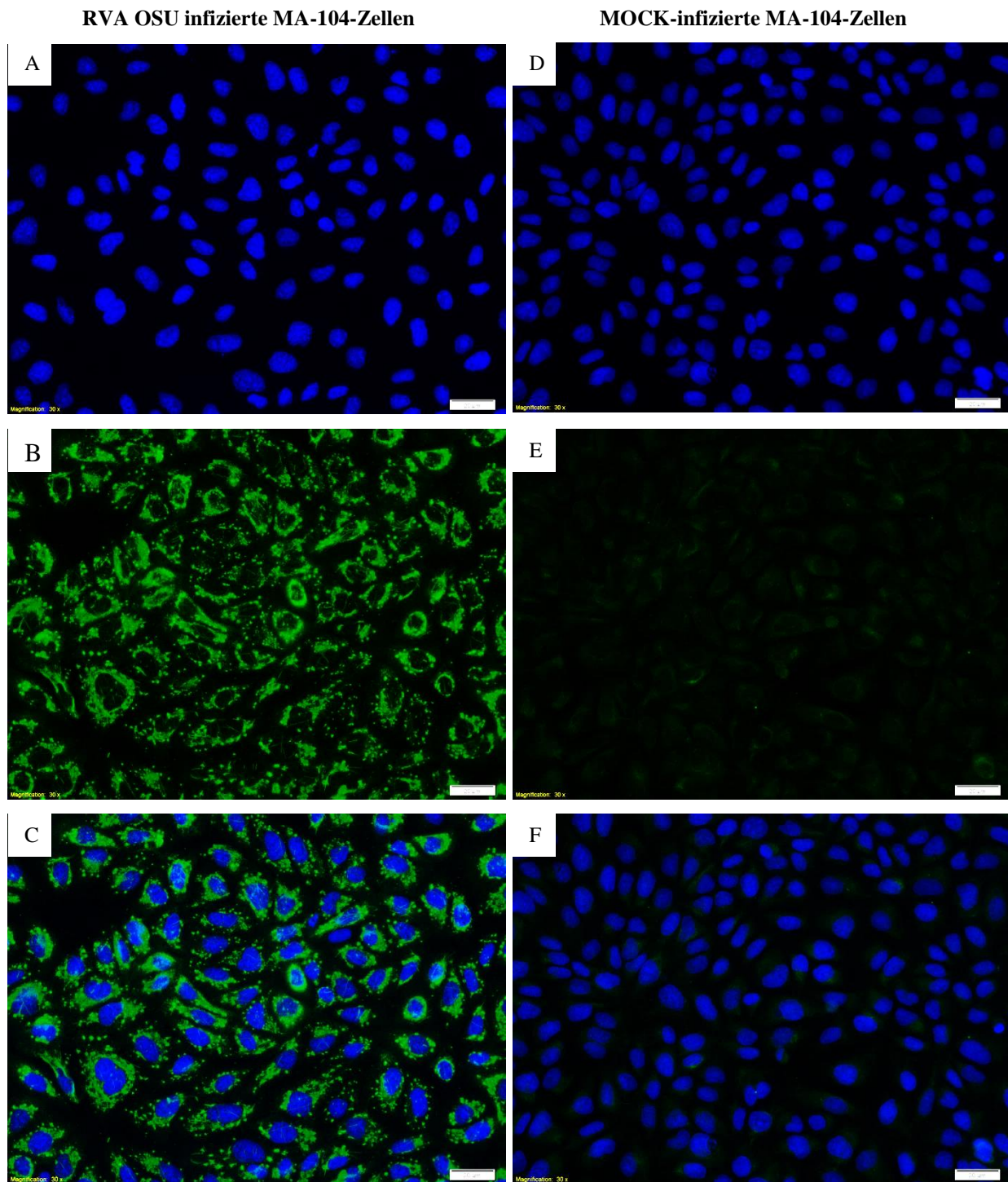
## **4.6 Serologische Untersuchung von porzinem Probenmaterial**

Für die serologischen Untersuchungen des porzinen Probenmaterials, welches in der Tabelle 7 aufgelistet ist, wurden die transfizierten und infizierten MA-104- sowie die infizierten ST-Zellen herangezogen. Diese wurden mittels Antigen-Antikörper-Reaktionen zum einen auf Antikörper gegen die Rotaviren der Gruppen A und C untersucht und zum anderen auf spezifische Antikörper, welche gegen das Enterotoxin NSP4 gerichtet sind. Der Nachweis erfolgte mittels indirekten IFA.

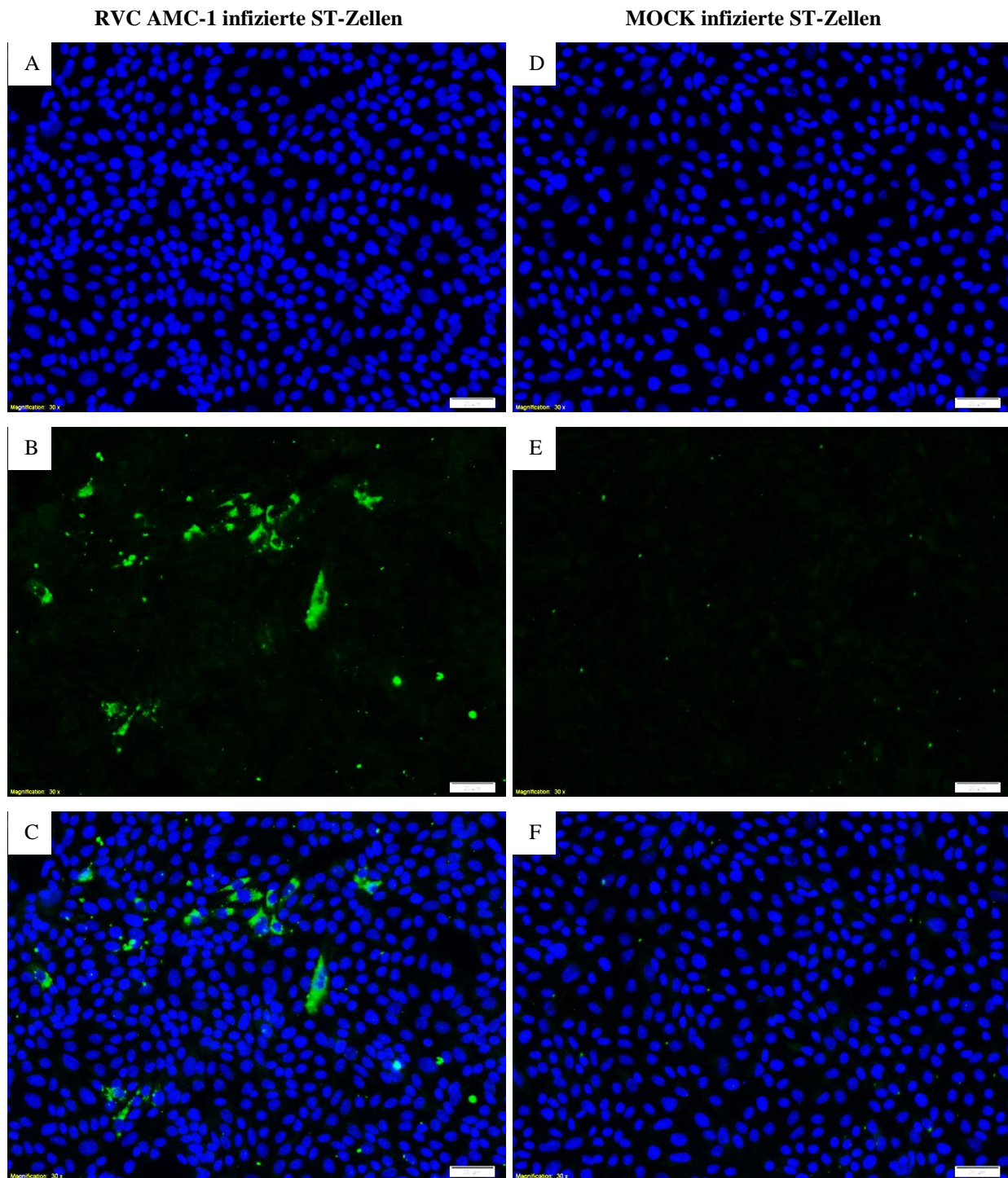
### **4.6.1 Nachweis von Antikörpern gegen Rotaviren der Gruppe A und C**

Für den Nachweis von Antikörpern gegen Rotaviren der Gruppe A fanden Rotavirus infizierte MA-104-Zellen Verwendung. Der Nachweis von Antikörpern gegen Rotaviren der Gruppe C erfolgte durch die Infektion von ST-Zellen mit dem AMC-1-Stamm. Anhand der beiden Abbildungen 15 und 16 sind hierfür exemplarisch die Resultate für Milchproben des Bestandes 10 im Hinblick auf den Nachweis spezifischer Antikörper gegen RVA und RVC dargestellt.

In der Abbildung 13 ist eine Gegenüberstellung von mit RVA-OSU infizierten MA-104-Zellen und einer nicht infizierten Kontrollkultur gezeigt. Die NK wurde mitgeführt, um eine mögliche unspezifische Färbung zellulärer Proteine auszuschließen. Die blaue Zellkernfärbung wurde in beiden Fällen durch den fluoreszierenden DNA-Farbstoff DAPI hervorgerufen, welcher eine Detektion intakter Zellen ermöglicht. Aufgrund des cyan-grünen Farbstoffes, der an den sekundären Antikörpern gekoppelt ist, konnte eine Bindung an die spezifischen Antikörper gegen RVA im Probenmaterial sichtbar gemacht werden. In der NK ist dagegen wie erwartet keine spezifische Färbung aufgetreten. Der IFA wurde bei allen Serum- und Milchproben durchgeführt, wobei jedes der eingesetzten Probenmaterialien spezifische Antikörper gegen RVA aufwies.



**Abbildung 13:** Nachweis von Antikörpern gegen RVA in porzinen Milchproben. Zur Detektion einer positiven Immunantwort gegen Rotaviren der Gruppe A wurde eine Gegenüberstellung von mit dem RVA-OSU-Stamm infizierten MA-104-Zellen [A, B, C] und uninfizierten Zellen [D, E, F] durchgeführt. Mittels DAPI wurde eine blaue Zellkernfärbung [A, D] vorgenommen. Anhand des grünfluoreszierenden sekundären Antikörpers konnten indirekt Antikörper in der Milchprobe gegen RVA [B] ausgemacht werden. Mit Hilfe der Negativkontrolle [E] zeigte sich, dass es sich bei der Färbung der infizierten Zellen um ein spezifisches Fluoreszenzsignal handelt. Der *Overlay* [C, F] dient zur Lokalisation der markierten RV-Proteine.



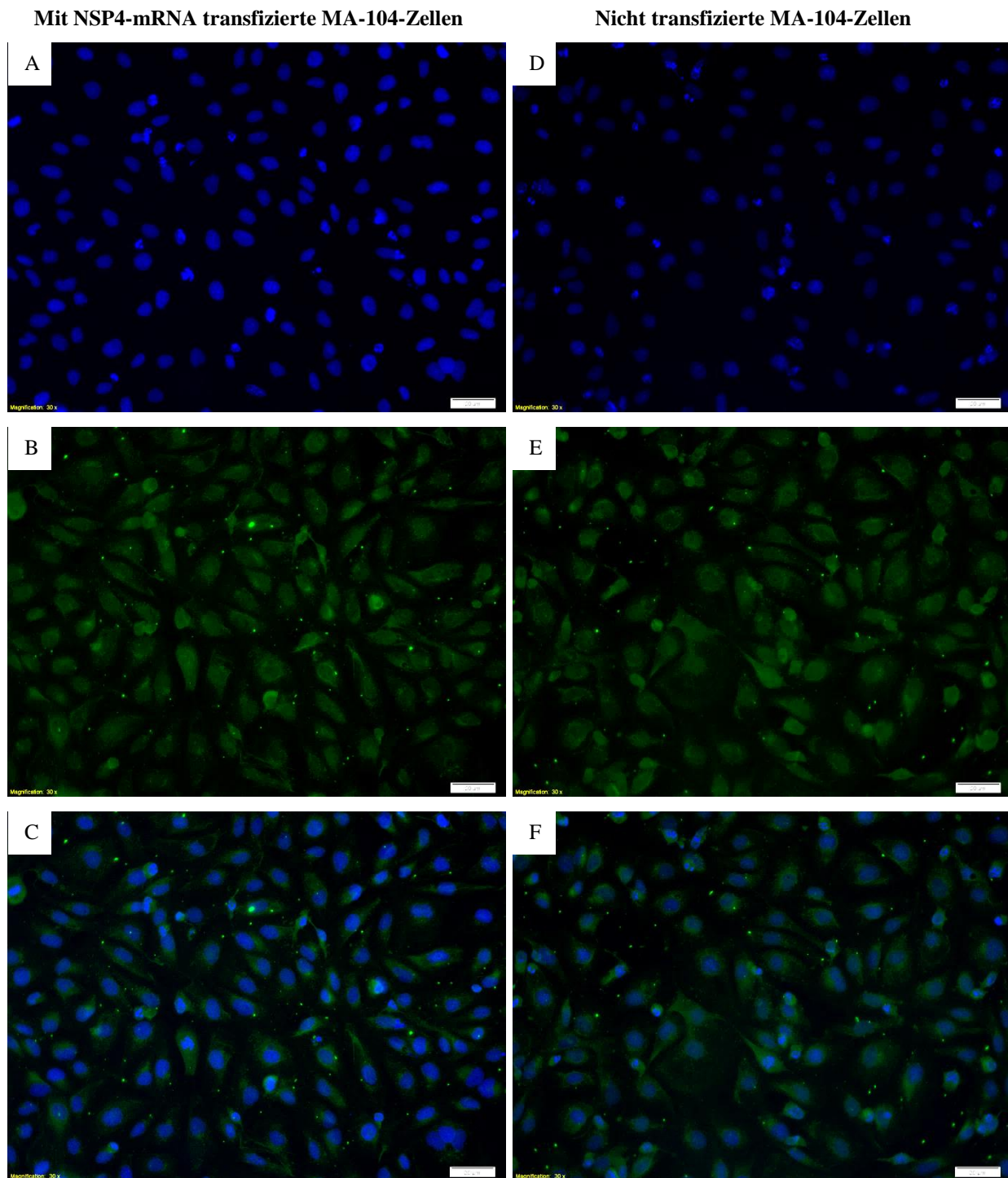
**Abbildung 14:** Nachweis von Antikörpern gegen RVC in porzinen Milchproben. Zur Detektion einer positiven Immunantwort gegen Rotaviren der Gruppe C wurde eine Gegenüberstellung von mit RVC-AMC-1 infizierten ST-Zellen [A, B, C] und uninfizierten Zellen [D, E, F] durchgeführt. Mittels DAPI wurde eine blaue Zellkernfärbung [A, D] vorgenommen. Anhand des grünfluoreszierenden sekundären Antikörpers konnten indirekt Antikörper in der Milchprobe gegen RVC [B] ausgemacht werden. Mit Hilfe der Negativkontrolle [E] zeigte sich, dass es sich bei der Färbung der infizierten Zellen um ein spezifisches Fluoreszenzsignal handelt. Der *Overlay* [C, F] dient zur Lokalisation der markierten RV-proteine.

Die Gegenüberstellung RVC-infizierter ST-Zellen und der dazugehörigen MOCK-Infektion in der Abbildung 14 veranschaulicht die Anwesenheit spezifischer Antikörper gegen RVC im untersuchten Probenmaterial. Die NK diente der Sicherstellung, dass es sich im Falle einer Färbung in den infizierten Zellen, um keine zellulären Proteine handelt und dient demnach dem Nachweis der Spezifität. Mittels des Fluoreszenzfarbstoffs DAPI wurden die Zellkerne blau angefärbt, wodurch eine Unterscheidung von intakten und defekten Zellen möglich ist. In dieser Arbeit wurden alle Serum- und Milchproben im IFA auf die Anwesenheit spezifischer Antikörper gegen RVC getestet. Dabei fanden sich in allen Probenmaterialien, unabhängig von den beschriebenen klinischen Symptomen oder dem Nachweis von viralen Partikeln mittels RT-PCR, nachweisbare anti-RVC-Antikörper.

#### **4.6.2 Nachweis spezifischer Antikörper gegen das Nichtstrukturprotein 4**

Um die im porzinen Probenmaterial nachgewiesenen anti-Rotavirus-Antikörper näher charakterisieren zu können, wurden eukaryotische Zellen mit der artifiziellen für NSP4 kodierenden mRNA transfiziert und einem indirektem IFA unterzogen. Auf diese Weise sollten alle Antikörper, die gegen das Enterotoxin gerichtet sind, nachgewiesen werden. In der Abbildung 15 ist anhand der Milchprobe aus dem Bestand 10 exemplarisch ein solches IFA-Ergebnis dargestellt.

In der Abbildung 15 sind mit NSP4-mRNA transfizierte MA-104-Zellen dargestellt, welche Aufschluss über die Anwesenheit von anti-NSP4-Antikörpern geben sollen. Zusätzlich zu den transfizierten Zellen wurde eine NK mitgeführt, damit eine unspezifische Färbung zellulärer Proteine ausgeschlossen werden konnte. Für eine erfolgreiche Detektion wurden die Zellkerne mittels des fluoreszierenden DNA-Farbstoffs DAPI blau gefärbt. Dies ermöglichte eine Aussage darüber zu treffen, welche Zellen intakt und welche defekt sind. Nach Zugabe des sekundären Antikörpers sollte eine Bindung an die anti-NSP4-Antikörper in den Serum- und Milchproben erfolgen. Wie aus der Abbildung 15 jedoch ersichtlich wird, konnte kein spezifisches NSP4-Signal nachgewiesen werden, so dass keine anti-NSP4-Antikörper in der Milchprobe enthalten waren. Bei allen durchgeführten Experimenten waren im IFA negative Ergebnisse zu vernehmen. In keiner der analysierten Feldproben waren daher Antikörper, welche gegen NSP4 gerichtet sind, nachzuweisen.



**Abbildung 15:** Nachweis spezifischer Antikörper gegen RVA-NSP4. Für die Detektion von anti-NSP4-Antikörpern wurden MA-104-Zellen mit artifizieller NSP4-mRNA des RVA-OSU-Stammes transfiziert [A, B, C]. Dem gegenübergestellt ist die Negativkontrolle [D, E, F], bei der es sich um nicht transfizierte MA-104-Zellen handelt. Während die mittels DAPI gefärbten Zellkerne eine blaue Färbung annehmen [A, D], kommt es nach Zugabe der Milchprobe zu keiner spezifischen grünen Markierung der Zellen. Die Erscheinung der transfizierten Zellen ähnelt signifikant den Kontrollzellen. Es befinden sich demnach keine anti-NSP4-Antikörper in der Milchprobe.



## 5 Diskussion

### 5.1 Etablierung eines geeigneten Zellkultursystems

Als Grundlage für den serologischen Nachweis Virus-spezifischer Antikörper mittels IFA wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit sowohl infizierte als auch transfizierte Mammalia-Zellkulturen genutzt. Um sicherzustellen, dass die hierbei erhaltenen Resultate valide und reproduzierbar sind, mussten zunächst die Kultivierungs- und Testbedingungen optimiert werden.

Im Vergleich zu anderen Viren lassen sich Rotaviren in Zellkultursystemen nur schwierig kultivieren, so dass die Isolate nach der Anzucht oft nur geringe Virustiter aufweisen. Aus diesem Grund mussten Zellen genutzt werden, welche eine hohe Permissivität für porcine Rotaviren aufweisen. Die Kultivierung erfolgte daher für RVA unter Verwendung von MA-104-Zellen (Guerrero et al., 2000; Otto et al., 2015), während für RVC ST-Zellen zum Einsatz kamen (Maunula et al., 1991; Welter et al., 1991). Zwar eignen sich diese Zelllinien gut für die Virusvermehrung, dennoch zeigen insbesondere Feldisolate oft nur einen geringen CPE, welcher sich durch ablösenden Zellen vom Boden des Kulturgefäßes oder einer kompletten Zelllyse auszeichnet (Arnold et al., 2012). Aus diesem Grund wurden für den IFA Zellkultur-adaptierte Rotavirus-Stämme genutzt, wobei es sich bei RVA um den OSU-Stamm und bei RVC um den AMC-1-Stamm handelte.

Damit die experimentellen Analysen korrekt und mit einer hohen Effizienz durchgeführt werden konnten, durften die Zellkulturen keine Kontaminationen mit Pilzen oder Bakterien aufweisen. Alle Zelllinien wurden daher ohne die Zugabe von Penicillin und Streptavidin passagiert, wodurch Kontamination, welche sich durch Verfärbungen und Trübungen des Mediums auszeichnen, schnell erkannt werden konnten. Eine Ausnahme stellen hierbei die Mykoplasmen dar. Diese färben bzw. trüben das Wachstumsmedium nicht, haben jedoch großen Einfluss auf den Stoffwechsel und Chromosomenhaushalt der Zellen (McGarrity & Kotani 1985). Die Chromosomenaberrationen bestehen häufig aus achromatischen Lücken und Chromatidbrüchen (Stanbridge, 1971) und beeinträchtigen den Lebenszyklus der Zellen vor allem bei starkem Befall signifikant. Darüber hinaus wird die Effizienz von Infektionen oder Transfektionen verringert, wenn eine Hyperinfektion mit mehreren Erregern vorliegt. Aus diesem Grund waren regelmäßige Mykoplasmentests (siehe Abbildung 9) nötig, um Kontaminationen auszuschließen. Neben den routinemäßigen Mykoplasmentests im Abstand von maximal vier Wochen, wurden die Zellen nach jedem neuen Auftauen überprüft, da bereits im Stickstoffbehälter eine Kontamination vorliegen könnte.

Neben der Reinheit ist die Effizienz und Reproduzierbarkeit auch vom Alter der Zellkultur abhängig. Da der Alterungsprozess nach jeder Passage zunimmt, wurden zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit von Transfektion und Infektion stets bei einer Passage von maximal 65 neue MA-104- bzw. ST-Zellen zur weiteren Verwendung genutzt. In einem Report von Welter et al. aus dem Jahr 1991, welcher die Adaptation von ST-Zellen für die Infektion mit RVC betrachtete, wurde mit bis zu 100 Zellkulturpassagen gearbeitet und keine Veränderungen im Wachstumsverhalten der Zellen wahrgenommen. Es ist daher davon auszugehen, dass auch die für diese Arbeit genutzten Zellkulturpassagen vergleichbar sind.

Da für die Transfektionen sowie die Virusinfektionen unterschiedliche Zellzahlen genutzt werden, wurde des Weiteren die optimale Anzahl ausplattierter Zellen bestimmt (siehe Abbildung 10). Die benötigten Zellzahlen sind dabei hauptsächlich von der Zellgröße und der Generationszeit der verschiedenen Zelllinien sowie dem Handling des Experimentators abhängig. Zusammen mit der Bestimmung der Inkubationszeiten ist die Zellzahl daher ein entscheidender Parameter für das Erreichen einer hohen Transfektions- und Infektionseffizienz. Die optimalen Zellzahlen für die Transfektion sind den Herstellerprotokollen des jeweiligen Reaktionssystems unter Punkt 2.9 zu entnehmen und erwiesen sich für die in dieser Arbeit eingesetzten Zellkulturen als ideal. Für die Infektionen wurden, wie aus dem Report von Guerrero et al. aus dem Jahre 2000, MA-104- und ST-Zellen verwendet, welche eine optische Konfluenz von 100% aufwiesen. Dass selbst beim Erreichen einer optischen Konfluenz von 100 % noch Zellteilungen erfolgen, wird aus der Abbildung 10 ersichtlich. Damit konnte gezeigt werden, dass diese optische Konfluenz deutlich unterhalb der realen Konfluenz liegt und im Vorfeld solcher zellbiologischen Verfahren stets eine Optimierung der Zellzahlen erfolgen sollte. Für Infektionen mit Rotaviren ist dies darüber hinaus essentiell, da für eine Anzucht Trypsin zur Spaltung des Oberflächenproteins VP4 benötigt wird. Diese Spaltung von VP4 ist auch unter physiologischen Bedingungen für die Rezeptorbindung nötig (Beards, 2017; Dormitzer et al., 2002). Zu hohe Trypsinkonzentrationen wirken jedoch toxisch auf die Zellen und führen damit zum Absterben der Kultur. Aufgrund verschiedener Literaturangaben wie bspw. den Reports von Maunula et al. aus dem Jahr 1991 und Arnold et al. aus 2012 zu der verwendeten Menge des Trypsingehalts (0,5 µg/ml – 10 µg/ml), wurde experimentell ein Gleichgewicht zwischen der benötigten und der maximalen Trypsinkonzentration ermittelt. Die Endkonzentration des Trypsins im Infektionsmedium betrug schließlich 2µg/ml und lag damit optimal im publizierten Bereich.

Die während dieser Arbeit erfolgreich etablierten Protokolle für die Transfektion und Rotavirusinfektion von MA-104- und ST-Zellen können zukünftig als Grundlage für weitere Analysen verwendet werden.

## 5.2 Generierung von rekombinanten Nukleinsäuren

Die Generierung rekombinanter Nukleinsäuren war erforderlich, um das Enterotoxin NSP4 der Zellkultur adaptierten Stämme OSU und AMC-1 in permissive Zellen zu transfizieren und einen Nachweis von anti-NSP4-Antikörper im Probenmaterial zu ermöglichen.

Dabei wurden die PCR-Produkte, welche mittels RT-PCR gewonnen wurden, als Ausgangsmaterial zur Generierung von kodierender mRNA oder Plasmid-DNA verwendet. Der Nachweis für die erfolgreiche Generierung der Nukleinsäuren erfolgte in beiden Fällen mittels Agarose-Gelelektrophorese und das dazugehörige Gelbild ist in der Abbildung 3 dargestellt. Es zeigte sich sowohl für das Gensegment von RVA als auch für RVC eine einzelne Bande, die auf ein hochspezifisches Binden der Primer hindeutet. Zu einer erfolgreichen Gewinnung der Nukleinsäuren führte nachfolgend die Reinigung der PCR-Produkte, wodurch Salze und Proteine entfernt wurden. Der Reinheitsgrad der PCR-Produkte wurde anschließend spektrophotometrisch bestimmt und es kamen nur die PCR-Produkte zum Einsatz, bei denen der 260/280-Wert größer als 1,8 war und damit möglichst reine DNA vorhanden war (Scientific T, 2011). Außerdem wurden nur die Produkte verwendet, die nicht degradiert vorlagen, was sich im Agarosegel durch eine einzelne, klare Bande mit der erwarteten Größe zeigte.

Um sicherzustellen, dass während der RT-PCR auch die korrekten Produkte amplifiziert werden konnten, wurden die Gensegmente zusätzlich nach Sanger sequenziert (Sanger et al., 1977). Mit Hilfe der Sequenzanalyse konnte ein Abgleich mit bekannten NSP4-Sequenzen der Rotavirusgruppen A und C aus der *NCBI*-Datenbank erfolgen und Mutationen sowie mögliche Frameshifts, welche die Proteinexpression inhibieren, ausgeschlossen werden. Der phylogenetische Baum, in der Abbildung 6, veranschaulicht das erwartungsgemäße Cluster von RVA und RVC. Die Anwendung der im Jahre 1987 von Saitou und Nei vorgestellten *Neighbor-Joining*-Methode verdeutlicht eine Einordnung der jeweiligen Genotypen anhand der Hauptäste (Saitou & Nei, 1987). Wie zu erwarten war, unterscheiden sich die Nukleinsäuresequenzen des Gensegments 10 von RVA und RVC signifikant. Dass diese Unterschiede auch auf der Proteinebene vorliegen und sich ebenso bei der Ausbildung potentieller Epitope widerspiegeln, wird darüber hinaus aus der Abbildung 7 deutlich.

Zur Gewinnung der Plasmid-DNA wurde das PCR-Produkt in den pJET1.2/Blunt-Vektor kloniert und anschließend in chemisch kompetente *E.coli* XL10-GOLD-Zellen transformiert. Der pJET1.2/Blunt-Vektor weist *upstream* des Inserts einen T7-Promotor auf, von dem eine Transkription des Zielgens ausgehen kann. Voraussetzung ist jedoch das Vorhandensein der zugehörigen T7-RNA-Polymerase in den transfizierten Zellen. Die Verwendung von Plasmid-DNA im Vergleich zur mRNA hat den Vorteil, dass die DNA leicht vermehrt und kostengünstig hergestellt werden kann (Mülhardt, 2013). Darüber hinaus ist die doppelsträngige Plasmid-DNA in transfizierten Zellen oft stabiler als die einzelsträngige mRNA, so dass eine längere Proteinexpression erreicht werden kann. Die Abbildungen 6 (NSP4 von RVA) und 7 (NSP4 von RVC) veranschaulichen ausgewählte *E.coli*-Transformanten nach der Kolonie-PCR, von denen einige das NSP4-Insert erfolgreich aufgenommen haben. Die PCR-Produkte der anderen Kolonien wies hingegen eine zu geringe Größe auf, was auf den Einbau eines Abbaufragments oder eines Fehlkonstrukts zurückzuführen ist. Für die Plasmidpräparation und die weiteren experimentellen Arbeiten wurden schließlich nur die Klone mit korrekter Insertion herangezogen.

Zur Gewinnung der mRNA wurden die gereinigten und überprüften PCR-Produkte als Ausgangsmaterial für die *in vitro* Transkription genutzt. Die originale virale mRNA weist eine gecappte, jedoch nicht polyadenylierte Struktur auf (Desselberger, 2014), weshalb für die artifiziellen mRNAs ebenfalls das *Capping* des 5'-Terminus erfolgte. Zwar besitzen die Rotavirus-mRNAs keinen poly(A)-Schwanz, dennoch wurde eine Polyadenylierung am 3'-Ende vorgenommen. Dies resultierte aus der Eigenschaft, dass nicht polyadenylierte mRNAs im Zytoplasma rasch degradiert werden (Liu et al., 2014). Die Integrität der mRNAs wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft und ist für die Rotavirusgruppen A und C in der Abbildung 8 dargestellt. Während sich ein RNase-Abbau der mRNAs durch eine Schmierbildung auf dem Agarosegel zeigt, sind in der Abbildung 8 klare, deutlich abgegrenzte Fragmente auszumachen. Die verschiedenen Bandengrößen sind vermutlich auf die unterschiedlich langen poly(A)-Schwänze zurückzuführen, die während der Polyadenylierung entstanden sind und mindern nicht die Qualität der hergestellten mRNAs.

Trotz der aufwendigeren Gewinnung wurde für alle nachfolgenden Experimente auf die mRNA zurückgegriffen, da diese sich, im Gegensatz zur Plasmid-DNA, durch eine bessere Transfektionseffizienz sowie eine schnellere Proteinexpression in den transfizierten Mammalia-Zellen auszeichnet.

### 5.3 Nachweis spezifischer porciner Antikörper

Bei Nutztieren, wie den Schweinen, konzentrieren sich die Impfstoffstrategien auf die Induktion aktiver und passiver Immunität, jedoch war die orale Verabreichung von attenuierten RV-Impfstoffen an Ferkeln häufig nicht wirksam (Vlasova et al., 2017). Da Ferkel ohne RV-Antikörper geboren werden (Salmon et al., 2009), zu wenig Zeit nach der Geburt für eine aktive Impfung ist, da eine RV-Infektion sehr früh auftritt und rapide verläuft sowie keine Übertragung der Antikörper über die epitheliochoriale Plazenta erfolgt (Šterzl et al. 1966), wird eine laktogene Immunität in den Sauen angestrebt. Dies hätte zur Folge, dass dem Neugeborenen passive Antikörper über das Kolostrum und der Milch zugeführt werden. Ein Erfolg von Muttertierimpfungen auf dem Feld wird durch die Impfstoffdosis, dem RV-Stamm, den Inaktivierungsmitteln, den Adjuvantien und dem Verabreichungsweg beeinflusst (Vlasova et al., 2017). Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist auf dem deutschen Markt jedoch kein lizenzierter Impfstoff gegen Rotaviren beim Schwein zugelassen. Nur durch die genaue Analyse der humoralen Immunantwort bei jungen Ferkeln kann eine Verbesserung dieser Situation und eine Etablierung neuer Vakzinen mit verbesserten Antigenen ermöglicht werden.

Für die Analyse der Feldsituation wurde aus diesem Grund der indirekte IFA angewandt, welcher zumeist sensitiver als das direkte Verfahren ist. Der Grund dafür ist der Fluorchromgekoppelte Sekundärantikörper, welcher mehrfach den Primärantikörper bindet und damit zu einer Steigerung der Signalstärke führt (Lodish et al., 2008). Wie der Tabelle 7 entnommen werden kann, zirkulieren im Schwein RVA und RVC, weshalb eine Analyse dieser beiden Virusgruppen angestrebt wurde. Die auf diese Weise generierten Resultate sollen in den nachfolgenden Kapiteln zusammengefasst und diskutiert werden.

#### 5.3.1 Unter Verwendung infizierter Zellkulturen

Zur näheren Untersuchung auf Anwesenheit von Antikörper in dem Probenmaterial erfolgte ein Nachweis von spezifischen porcinen Antikörpern gegen RVA und RVC. Dabei wurden die permissiven Zellen entweder mit dem RV-Stamm OSU oder dem RV-Isolat AMC-1 infiziert. Um eine optimale Infektionseffizienz zu gewährleisten, wurden zunächst Protokolle für die Infektion etabliert. Hierbei lag der Fokus insbesondere auf der Menge des benötigten Trypsins, welches bei RV-Stämmen der Spaltung von VP4 in VP5\* und VP8\* dient (Beards, 2017). Ist eine zu hohe Menge des Trypsins vorhanden, wirkt sich dies toxisch auf die Zellen aus. Bei zu geringer Konzentration allerdings kommt es nicht zur Spaltung von VP4, was sich

wiederum negativ auf die Rezeptorbindung der Viren auswirkt (Dormitzer et al., 2002). Für die in dieser Arbeit vorgenommenen Untersuchungen ergab sich schließlich eine Trypsinkonzentration von 2 µg/µl als ideal. Ähnliche Trypsinkonzentrationen sind auch für die Verwendung weiterer Isolate und Zelllinien beschrieben, so dass das etablierte Protokoll im Wesentlichen der publizierten Empfehlungen zur Propagierung von Rotavirus-Stämmen folgt (Gray & Desselberger 2000).

Darüber hinaus wurden, wie in den Darstellungen zum Nachweis von RVA (Abbildung 13) und RVC (Abbildung 14) ersichtlich, stets MOCK-Infektionen als Negativkontrollen mitgeführt. Anhand derer kann eine unspezifische Färbung zellulärer Proteine ausgeschlossen werden. Des Weiteren wurde ein polyklonaler Antikörper als Positivkontrolle zum Nachweis einer erfolgreichen Infektion genutzt. Hierbei zeigte sich, dass eine Färbung der viralen Proteine in den infizierten Zellen stets im Zytoplasma zu beobachten und nie im Zellkern zu vernehmen ist. Der Grund dafür sind, wie bei McDonald und Patton im Jahre 2011 zum Replikationszyklus von Rotaviren beschrieben, die Transkriptionsprodukte der (+)ssRNA, welche im Viroplasma akkumulieren und dort zur Translation viraler Proteine durch die Ribosomen des Wirtes führen. Die hierbei entstehenden viralen Proteine weisen keinerlei Lokalisationssignale für den Kern auf und liegen daher ausschließlich im Zytoplasma vor (Estes & Greenberg 2013).

Wie den Ergebnissen zu entnehmen ist, wurden bei der Infektion mit Vollvirus-Isolaten RV-spezifische Antikörper (siehe Abbildung 13 und 14) sowohl in sämtlichen Milch- als auch Serumproben nachgewiesen, wobei alle Probenmaterialien, unabhängig vom PCR-Resultat und der Klinik positiv waren. Sowohl für RVA als auch für RVC waren Antikörper vorhanden. Anhand des Nachweises kann jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, gegen welches der RV-Proteine die Immunantwort gerichtet ist. Neben NSP4 sind vor allem die Strukturproteine VP4, VP6 und VP7 wahrscheinlich, da es sich bei ihnen um Antigene handelt, die in hohen Konzentrationen und im Partikel auf der Oberfläche exponiert vorliegen (Li et al., 2009; Ruiz et al., 2009). Des Weiteren gibt der Nachweis der Antikörper noch keinen Aufschluss darüber, ob eine Protektivität gegen die Infektionen vorliegt. Zur Klärung dieser Fragestellung müsste statt eines IFAs ein Neutralisationstest angewandt werden, welcher für die Rotaviren allerdings aufgrund der schwierigen Infektionsbedingungen und der komplizierten Anzucht schwer durchzuführen ist. Die Etablierung eines solchen Tests in nachfolgenden Forschungsprojekten sollte allerdings angestrebt werden, da mittels des

Neutralisationstests ebenfalls eine Aussage bezüglich einer Kreuzreaktivität der Antikörper für RVA und RVC getroffen werden könnte.

Des Weiteren wird anhand der Ergebnisse ersichtlich, dass die ELISA-Resultate nicht so sensitiv ausfallen wie die des IFAs. Trotz der Tatsache, dass ein ELISA schneller und ebenfalls kostengünstiger in der Routinediagnostik durchzuführen ist, sollte ergänzend ein IFA genutzt werden, damit nicht die Gefahr eines falsch negativen Ergebnisses besteht.

### **5.3.2 Nach Transfektion von NSP4-mRNA**

Nachdem mit den infizierten Zellen gezeigt werden konnte, dass anti-Rotavirus-Antikörper in allen Probenmaterialien enthalten waren, sollte die Spezifität dieser Immunglobuline mittels transfizierter Zellen untersucht werden.

Zu Beginn wurde die Effizienz der Transfektion mittels eines für das GFP kodierenden Plasmids getestet. Da es sich bei GFP um ein Protein mit Eigenfluoreszenz handelt, musste keine weitere Immunfärbung für die Analyse durchgeführt werden. Das im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Plasmid pTIT-GFP eignete sich daher besonders gut zur Optimierung der Transfektionsbedingungen. Da die Effizienz der Transfektion von BSR-T7-Zellen vergleichsweise hoch war und ungefähr 75 % betrug, ist in der Abbildung 11 gezeigt. Im Anschluss wurde die für NSP4 kodierende Plasmid-DNA in die BSR-T7-Zellen transfiziert, wobei trotz intakter DNA und einer korrekten Sequenz der Plasmid-DNA auch unter Verwendung eines polyklonalen anti-NSP4-Antikörpers keine Proteinexpression nachgewiesen werden konnte. Es musste daher davon ausgegangen werden, dass in den transfizierten Zellen kein NSP4 vorlag und sich diese daher nicht für den Detektion von anti-NSP4-Antikörpern eigneten.

Der Nachweis spezifischer anti-NSP4-Antikörper in den Probenmaterialien erfolgte daher durch die Transfektion der artifiziellen NSP4-mRNA von RVA in die permissiven MA-104-Zellen. Wie aus der Abbildung 15 ersichtlich wird, war die Expression von NSP4 in den transfizierten Zellen unter Verwendung des polyklonalen anti-NSP4-Antikörpers möglich. Die Serum- und Milchproben konnten daher mittels der transfizierten MA-104-Zellen untersucht werden, zeigten jedoch in keinem Fall ein positives Ergebnis für anti-NSP4-Antikörper. Neben der Tatsache, dass während einer Rotavirusinfektion keine Immunantwort gegen das Enterotoxin gebildet wird, ist auch eine zu geringe Sensitivität des IFA als Ursache denkbar. Dies könnte an der hohen Toxizität von NSP4, welches als Viroporin wirkt, liegen

(Ball et al., 2005; Hyser et al., 2010). Auch könnte dies die hohe Anzahl abgestorbener Zellen erklären, welche nach der Transfektion, wahrscheinlich durch eine Überexpression von NSP4, zu beobachten war. Da eine Expression ausgehend vom T7-Promotor zumeist höher ausfällt als bei der Transfektion von kodierender mRNA, kann die starke Zytotoxizität von NSP4 auch eine Erklärung für die fehlende Proteinexpression beim Einsatz von Plasmid-DNA darstellen.

Eine Optimierung in Hinblick auf die Toxizität könnte eine Trunkierung des N-terminalen Endes von NSP4 liefern. Im Jahre 2000 haben Browne et al. einen Versuch für eine mögliche Basis der Zytotoxizität von NSP4 in Säugerzellen angestrebt. Insbesondere die hydrophoben Bereiche im N-Terminus von NSP4 sind dabei für den zytotoxischen Effekt verantwortlich und wurden näher betrachtet. Die Trunkierung dieser Regionen würde eventuell die Toxizität stark vermindern, jedoch würde dann nicht das gewünschte Vollängenprotein exprimiert werden und potentielle Zielepitope könnten verlorengehen. Eine weitere Möglichkeit zur Optimierung wäre die Anpassung der Inkubationszeit. Hier müsste ein Zeitpunkt erfasst werden, bei dem NSP4 ein geringes Maß an Toxizität sowie eine solch hohe Menge im Zytoplasma aufweist, dass anti-NSP4-Antikörper nachgewiesen werden könnten.

Es wäre weiterhin denkbar, dass zwar anti-NSP4-Antikörper im Probenmaterial vorhanden sind, jedoch der IFA nicht sensitiv genug ist, um die Antikörper mittels Mikroskop für das menschliche Auge sichtbar zu machen. Die verwendete Verdünnung der Serum- bzw. Milchproben von 1:75 könnte hierbei zu hoch gewesen sein. Eine geringere Verdünnung des Probenmaterials würde jedoch zur Steigerung des unspezifischen Hintergrundsignals führen und damit eine Analyse erschweren und gegebenenfalls zu falschen Resultaten führen. Zur Behebung dieses Problems könnte die Durchflusszytometrie zum Einsatz kommen. Dieser erlaubt es, auch minimale Mengen an Antikörper-markierten Proteinen innerhalb transfizierter Zellen zu detektieren. Da für diese Methode jedoch eine vergleichsweise große Zahl an analysierten Zellen und damit große Mengen an mRNA und Antikörpern benötigt werden, wurden im Rahmen dieser Arbeit keine durchflusszytometrischen Untersuchungen durchgeführt. Sollten sich jedoch auch mit diesem Verfahren keine anti-NSP4-Antikörper nachweisen lassen, müssen die detektierten anti-Rotavirus-Antikörper gegen andere virale Proteine gerichtet sein. Hierbei würden sich vor allem die viralen Proteine 4, 6 und 7 anbieten, da diese für die Anheftung und Infektion der Wirtszelle unerlässlich sind (McDonald & Patton, 2011; Ruiz et al., 2009). Zum Nachweis von porzinen Antikörpern



gegen VP4, VP6 oder VP7 können die in dieser Arbeit etablierten Protokolle in analoger Weise verwendet werden.

Das Auftreten von anti-NSP4-Antikörpern von RVC konnte nicht untersucht werden, da kein definiert positives Serum zum Nachweis der Funktionalität der RVC-NSP4-mRNA vorhanden war. Um ein solches Hyperimmunserum gewinnen zu können, sollten zukünftig Immunisierungen mit rekombinanten RVC-NSP4, beispielsweise im Kaninchen, durchgeführt werden.

Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass es sich bei NSP4 vermutlich um keinen Impfstoffkandidaten handelt, da anti-NSP4-Antikörper bei porzinen Feldinfektionen weder in der Milch noch im Serum vorhanden waren.

#### **5.4 Zusammenfassung / Ausblick**

In der vorliegenden Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, ob eine Feldinfektion mit porzinen Rotaviren zur Ausbildung einer Immunantwort gegen das virale Enterotoxin NSP4 führt. Dazu wurden Serum- sowie Milchproben aus Saugferkelbeständen für den Nachweis von Antikörpern gegen RVA und RVC verwendet. Die Probenmaterialien stammten aus Beständen, bei denen sowohl eine Durchfallssymptomatik als auch keine Anzeichen von Durchfall zu verzeichnen waren.

Um die Rotavirus-induzierte Immunantwort präzise analysieren zu können, wurden zunächst permissive Zellkultursysteme etabliert und optimale Zellzahlen sowie Inkubationszeiten bestimmt. Anschließend gelang es unter Verwendung infizierter Kulturen, in allen eingesetzten Proben Antikörper nachzuweisen, die sowohl für RVA als auch für RVC spezifisch waren. Um diese Antikörper weiter zu charakterisieren wurden mittels *in vitro* Transkription artifizielle, für das Enterotoxin NSP4 kodierende mRNAs erfolgreich hergestellt, in die Mammalia-Zellen transfiziert und die NSP4-Expression für RVA mittels eines Hyperimmunserums gezeigt. In den Serum- und Milchproben konnten jedoch keine anti-NSP4-Antikörper für RVA nachgewiesen werden. Dies kann zum einen darauf zurückzuführen sein, dass während einer Feldinfektion keine Immunantwort gegen das Enterotoxin erfolgt oder aber eine sehr geringe Anzahl von spezifischen Antikörpern vorhanden ist, welche nach dem IFA jedoch unter dem Mikroskop nicht sichtbar waren. Um die Sensitivität der Methode weiter zu erhöhen, könnte eine Durchflusszytometrie durchgeführt werden. Diese Methode bedarf allerdings einer Vielzahl von Zellen sowie

großer Volumina an eingesetzten Materialien und kann demnach nicht in dem hier angewendeten 96-Kavitätenformat durchgeführt werden.

Ein Nachweis auf Antikörper gegen RVC war nicht möglich, da kein Hyperimmunserum als Positivkontrolle vorhanden war. Für den Nachweis dieser Antikörper muss zunächst ein definiertes Serum durch die Immunisierung von Tieren mit rekombinantem Protein gewonnen werden. Anschließend wäre es möglich, den Nachweis spezifischer Antikörper mit den bereits etablierten Verfahren in analoger Weise durchzuführen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass zwar noch keine Aussage über NSP4 als möglichen Impfstoffkandidaten getroffen werden kann, jedoch die in der vorliegenden Arbeit angewandte Methodik erfolgreich etabliert wurde. Auf dieser Art und Weise können auch weitere Proteine des Rotavirus einfach und effizient nachgewiesen werden. Hierbei würden sich vor allem die Strukturproteine VP4, VP6 und VP7 anbieten, da es sich bei ihnen um Antigene handelt, die für die Anheftung an die Wirtszelle und die Infektion unerlässlich sind (McDonald & Patton, 2011).

#### IV. Literaturverzeichnis

- Alekseev, K.P., Penin, A.A., Mukhin, A.N., Khametova, K.M., Grebennikova, T.V., Yuzhakov, A.G., Moskvina, A.S., Musienko, M.I., Raev, S.A., Mishin, A.M., Kotelnikov, A.P., Verkhovsky, O.A., Aliper, T.I., Nepoklonov, E.A., Herrera-Ibata, D.M., Shepherd, F.K. und Marthaler, D.G. (2018): Genome characterization of a pathogenic porcine rotavirus B strain identified in Buryat Republic, Russia in 2015. *Pathogens*, **7(46)**:1-12.
- Alfieri, A.A., Leite, J.P.G., Alfieri, A.F., Jiang, B., Glass, R.I. and Gentsch, J.R. (1999): Detection of field isolates of human and animal group C rotavirus by reverse transcription-polymerase chain reaction and digoxigenin-labeled oligonucleotide probes. *Journal of Virological Methods*, **83(1-2)**:35-43.
- Arnold, M., Patton, J.T. und McDonald, S.M. (2012): Cultureing, Storage, and Quantification of Rotaviruses. *Curr Protoc Microbiol.*, **15C3**:1-29.
- Au, K.-S., Chan, W.-K., Burns, J.W. und Estes, M.K. (1989): Receptor activity of rotavirus nonstructural glycoprotein NS28. *Journal of Virology*, **63(11)**:4553-4562.
- Ball, J.M., Mitchell, D.M., Gibbons, T.F. und Parr, R.D. (2005): Rotavirus NSP4: A Multifunctional Enterotoxin. *Viral Immunology*, **18(1)**:27-40.
- Beards G. (2017): Rotavirus. *WikiJournal of Medicine*, **4(1)**:7.
- Bergmann, C.C., Maass, D., Poruchynsky, M.S., Atkinson, P.H. und Bellamy, A.R. (1989): Topology of the non-structural rotavirus receptor glycoprotein NS28 in the rough endoplasmic reticulum. *EMBO*, **8(6)**:1695-1703.
- Bishop, R.F., Davidson, G.P., Holmes, I.H. und Ruck, B.J. (1973): Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *The Lancet*, **302(7841)**:1281-1283.
- Buchholz, U.J., Finke, S., und Conzelmann, K.K. (1999): Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. *J. Virol.*, **73(1)**:251-9.

- Buttery, J.P., Lambert, S.B., Grimwood, K., Nissen, M.D., Field, E.J., Macartney, K.K., Akikusa, J.D., Kelly, J.J. und Kirkwood C.D. (2011). *Pediatr Infect Dis J*, **2011(30)**: 25-29.
- Charpilienne, A., Lepault, J., Rey, F. und Cohen, J. (2002): Identification of rotavirus VP6 redidues located at the interface with VP2 that are essential for capsid assembly and transcriptase activity. *Journal of Virology*, **76(15)**: 7822-7831.
- Chun, Y.-H., Jeong, Y.-J., Park, S.-I., Hosmillo, M., Shin, D.-J., Kwon, H.-J., Kang, S.-Y., Woo, S.-K., Kang, M.-I., Park, S.-J. und Cho, K.-O. (2010): Development of one-step real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays for rapid detection of porcine group C rotaviruses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **22(1)**:74-77.
- Cowling, V.H. (2010): Regulation of mRNA cap methylation. *Biochemical Journal*, **425**:295-302.
- Dennehy, P.H. (2000): Transmission of rotavirus and other enteric pathogens in the home. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, **19(10)**:103–105.
- Desselberger, U. (2014): Rotaviruses. *Virus Research*, **190**:75-96.
- Desselberger, U. und Huppertz, H.I. (2011): Immune Response to Rotavirus Infection and Vaccination and Associated Correlates of Protection. *The Journal of Infectious Diseases*, **203(2)**:188-195. Verfügbar bei: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiq031>.
- Dormitzer, P.R., Sun, Z.J., Blixt, O., Paulson, J.C., Wagner, G. und Harrison, S.C. (2002): Specificity and affinity of sialic acid binding by the rhesus rotavirus VP8\* core. *Journal of Virology*, **76(20)**:10512-10517.
- Estes, M.K., Graham, D.Y. und Mason, B.B. (1981): Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanism. *J. Virol.*, **39(3)**:879-888.
- Estes, M.K. und Greenberg, H.B. (2013): Rotaviruses. In *Fields Virology*, 6th Ed, Chapter 45, p1347-1401.
- Flewett, T.H., Bryden, A.S., Davies, H., Woode, G.N., Bridger, J.C. und Derrick, J.M. (1974): Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *The Lancet*, **304(7872)**:61–63.

- Fabbretti, E., Afrikanova, I., Vascotto, F. und Burrone, O.R. (1999): Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo. *Journal of General Virology*, **80**:333-339.
- Gray, J. & Desselberger, U. (Eds.) (2000): *Rotaviruses: Methods and Protocols*. Springer Science & Business Media, Vol 34.
- Grimwood, K. und Lambert, S.B. (2009): Rotavirus vaccines: Opportunities and challenges. *Human Vaccines*, **5**(2):57-69.
- Guerrero, C.A., Zárate, S., Corkidi, G., López, S. und Arias, C.F. (2000): Biochemical Characterization of Rotavirus Receptors in MA104 Cells. *Journal of Virology*, **74**(20):9362-9371.
- Hu, L., Crawford, S.E., Hyser, J.M., Estes, M.K. und Prasad, B.V.V. (2012): Rotavirus non-structural proteins: Structure and Function. *Curr Opin Virol.*, **2**(4):380-388.
- Hyser, J.M., Collinson-Pautz, M.R., Utama, B. und Estes, M.K. (2010): Rotavirus disrupts calcium homeostasis by NSP4 viroporin activity. *Department of Molecular Virology and Microbiology*, **1**(5):1-12.
- Hyser, J.M., Zeng, C.Q.-Y., Beharry, Z., Palzkill, T. und Estes, M.K. (2007): Epitope mapping and use of epitope-specific antisera to characterize the VP5\* binding site in rotavirus SA11 NSP4. *Virology*, **373**:211-228.
- Larsen, J.E., Lund, O. und Nielsen, M. (2006): Improved method for predicting linear B-Cell epitopes. *Immunome Research*, **2**(2):1-7.
- Li, Z., Baker, M.L., Jiang, W., Estes, M.K. und Prasad, B.V.V. (2009): Rotavirus architecture at subnanometer resolution. *Journal of Virology*, **83**(4):1754-1766.
- Liu, H., Luo, M. und Wen, J.-K. (2014): mRNA stability in the nucleus. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, **15**(5):444-454.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.S., Bretscher, A., Ploegh, H. und Matsudaira, P. (2008): *Molecular Cell Biology*. W.H. Freeman and Company, New York, **6<sup>th</sup> ed.**, 385.
- Marthaler, D., Rossow, K., Culhane, M., Collins, J., Goyal, S., Ciarlet, M. und Matthijnsens, J. (2013): Identification, phylogenetic analysis and classification of porcine group C

- rotavirus VP7 sequences from the United States and Canada. *Virology*, **446(2013)**:189-198.
- Mathieu, M., Petitpas, I., Navaza, J., Lepault, J., Kohli, E., Pothier, P., Prasad, B.V.V., Cohen, J. und Rey, F.A. (2001): Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: implications for the architecture of the virion. *The EMBO Journal*, **20(7)**:1485-1497.
- Matthews, R.E.F. (1979): Third report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Classification and nomenclature of viruses. *Intervirology*, **12(3-5)**:12 –296.
- Maunula, L., Svensson, L. und Bonsdorff, C.-H. (1991): A family outbreak of gastroenteritis caused by group C rotavirus. *Archives of Virology*, **124(1991)**:269-278.
- McDonald, S.M. und Patton, J.T. (2011): Assortment and packaging of the segmented rotavirus genome. *Laboratory of Infectious Diseases*, **19(3)**:136-144.
- McGarrity, G.J. und Kotani, H. (1985): Cell culture mycoplasmas. In *The mycoplasmas* (ed. Razin, S. und Barile, M.), Academic Press, New York, **vol. 4**, 353-390.
- Mülhardt, C. (2013): *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. Springer Spektrum, 7. Auflage.
- Otto, P.H., Reetz, J., Eichhorn, W., Herbst, W. und Elschner, M.C. (2015): Isolation and propagation of the animal rotaviruses in MA-104 cells – 30 years of practical experience. *Journal of Virological Methods*, **223(2015)**:88-95.
- Parashar, U.D., Gibson, C.J., Bresee, J.S. und Glass, R.I. (2006): Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis*, **12(2)**:304-306.
- Parashar, U.D., Hummelmann, E.G., Bresee, J.S., Miller, M.A. und Glass, R.I. (2003): Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis*, **9(5)**:565-572.
- Parr, R.D., Storey, S.M., Mitchell, D.M., McIntosh, A.L., Zhou, M., Mir, K.D. und Ball, J.M. (2005): The rotavirus enterotoxin NSP4 directly interacts with the caveolar structural protein caveolin-1. *Journal of Virology*, **80(6)**:2842-2854.
- Patton, J.T., Silvestri, L.S., Tortorici, M.A., Vásquez-del Carpio, R. und Taraporewala, Z.F. (2006): Rotavirus genome replication and morphogenesis: role of the viroplasm. In *Reoviruses: Entry, Assembly and Morphogenesis* (pp. 169-187). Springer Berlin Heidelberg.

- Patton, J.T., Vásquez-del Carpio, R. und Spencer, E. (2004): Replication and transcription of the rotavirus genome. *Pharmaceutical Design*, **10(30)**:3769-3778.
- Petrie, B.L., Graham, D.Y., Hanssen, H. und Estes, M.K. (1982): Localization of Rotavirus Antigens in Infected Cells by Ultrastructural Immunocytochemistry. *Journal of general Virology*, **63(2)**:457-467.
- Rao, V.C., Seidel, K.M., Goyal, S.M., Metcalf, T.G. und Melnick J.L. (1984): Isolation of enteroviruses from water, suspended solids, and sediments from Galveston Bay: survival of poliovirus and rotavirus adsorbed to sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, **48(2)**:404-409.
- Ruiz, M.C., Leon, T., Díaz, Y. und Michelangeli, F. (2009): Molecular biology of rotavirus entry and replication. *TheScientificWorldJournal*, **9**:1476-1497.
- Saitou, N. und Nei, M (1987): The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4(4)**:406-425.
- Salmon, H., Berri, M., Gerdts, V. und Meurens, F. (2009): Humoral and cellular factors of maternal immunity in swine. *Developmental and Comparative Immunology*, **33(2009)**:384-393.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceeding of National Academy of Science*, **74(12)**:5463-5467.
- Schwarz, B.-A., Bange, R., Vahlenkamp, T.W., Johne, R. und Müller H. (2002): Detection and quantification of group A rotaviruses by competitive and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, **105(2)**:277-285.
- Scientific T. (2011): NanoDrop Spectrophotometers. Technical Bulletin, **T042**.
- Seo, N.S., Zeng, C.Q.-Y., Hyser, J.M., Utama, B., Crawford, S.E., Kim, K.J., Höök, M. und Estes, M.K. (2008): Integrins  $\alpha 1\beta 1$  and  $\alpha 2\beta 1$  are receptors for the rotavirus enterotoxin. *PNAS*, **105(26)**:8811-8818.
- Stanbridge, E. (1971): Mycoplasmas and Cell Cultures. *Bacteriological Reviews*, **35(2)**:206-227.
- Šterzl, J., Rejnek, J. und Trávníček, J. (1966): Impermeability of Pig Placenta for Antibodies. *Folia Microbiologica*, **11(1)**:7-10.

- Surendran, S. (2008): Rotavirus Infection: Molecular changes and pathophysiology. *EXCLI Journal*, **7**:154–162.
- Tate, J.E., Buton, A.H., Boschi-Pinto, C und Parashar, U.D. (2016): Global, regional, and national estimates of rotavirus mortality in children <5 years of age, 2000-2013. *Clinical Infectious Disease*, **2016(62)**: 96-105.
- Taylor, J.A., O'Brien, J.A. und Yeager, M. (1996): The cytoplasmic tail of NSP4, the endoplasmic reticulum-localized non-structural glycoprotein of rotavirus, contains distinct virus binding and coiled coil domains. *EMBO*, **15(17)**:4469-4476.
- Tortorici, M.A., Broering, T.J., Nibert, M.L. und Patton, J.T. (2003): Template recognition and formation of initiation complexes by the replicase of a segmented double-stranded RNA virus. *Journal of Biological Chemistry*, **278(35)**:32673-32682.
- Tortorici, M.A., Shapiro, B.A. und Patton, J.T. (2006): A base-specific recognition signal in the 5' consensus sequence of rotavirus plus-strand RNAs promotes replication of the double-stranded RNA genome segments. *RNA*, **12(1)**:133-146.
- Vásquez-del Carpio, R., Morales, J.L., Barro, M., Ricardo, A. und Spencer, E. (2006a): Bioinformatic prediction of polymerase elements in the rotavirus VP1 protein. *Biological Research*, **39(4)**:649-659.
- Vlasova, A.N., Amimo, J.O. und Saif, L.J. (2017): Porcine Rotaviruses: Epidemiology, Immune Responses and Control Strategies. *Viruses*, **9(3)**:E48.
- Welter, M.W., Welter, C.J., Chambers, D.M. und Svensson, L. (1991): Adaptation and serial passage of porcine group C rotavirus in ST-cells, an established diploid swine testicular cell line. *Archives of Virology*, **120(1991)**:297-304.
- Xu, A., Bellamy, A.R. und Taylor, J.A. (2000): Immobilization of the early secretory pathway by a virus glycoprotein that binds to microtubules. *EMBO*, **19(23)**:6465-6474.



## Anhang

### Größenstandard

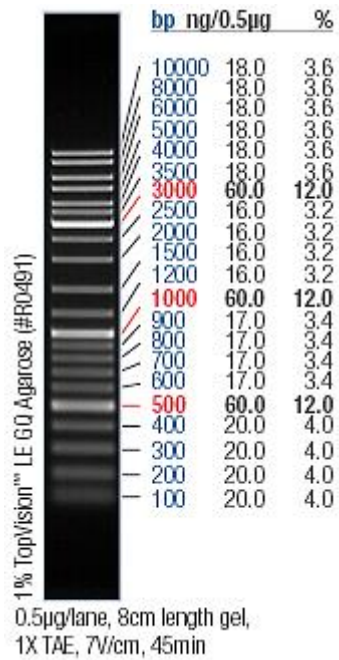
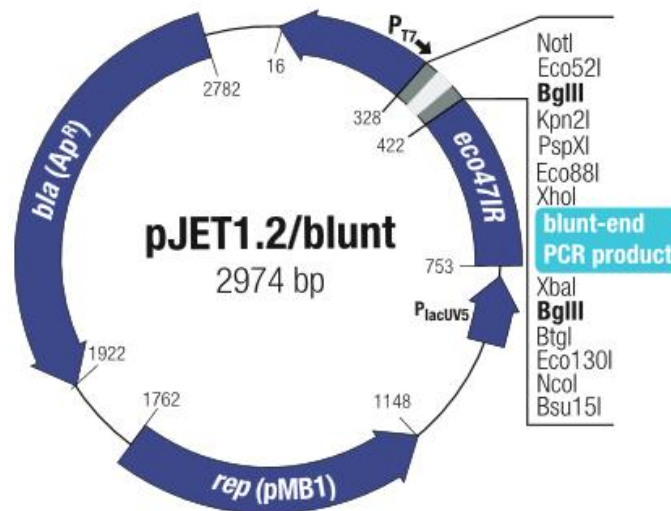


Abbildung 16: Bandenprofil des GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

## Vektorkarte



**Abbildung 17:** Verwendeter pJET1.2/Blunt-Vektor zur Klonierung von DNA-Fragmenten.

**Tabelle 15:** Elemente und deren Funktion sowie Position im Plasmid pJET1.2/blunt.

| Elemente                      | Funktion  | Position<br>(bp) |
|-------------------------------|---|------------------|
| Rep (pMB1)                    | Replicon vom pMBI-Plasmid; verantwortlich für die Replikation des pJET1.2.  | 1762 – 1148      |
| Replikationsstart             | Einleitung der Replikation.   | 1162 ± 1         |
| <i>bla</i> (Ap <sup>R</sup> ) | B-Lactamasegen konferiert die Ampicillinresistenz; für die Selektion und der Instandhaltung rekombinanter <i>E.coli</i> verantwortlich.                         | 2782 – 1922      |
| <i>Eco47IR</i>                | Das lethale Gen <i>eco47IR</i> ermöglicht die positive Selektion von rekombinanten Plasmiden.   | 753 – 16         |
| P <sub>lacUV5</sub>           | Modifizierter P <sub>lac</sub> -Promotor für die Expression des <i>eco47IR</i> -Gens in einem Ausmaß, das ausreicht, um eine positive Selektion zu ermöglichen. | 892 – 769        |
| T7-Promotor                   | T7-RNA-Polymerase Promotor für die <i>in vitro</i> Transkription des klonierten Insert.   | 305 – 324        |
| MCS                           | Zuordnung, Screening und Entfernung des klonierten Insert.  | 422 – 328        |
| Insertionsseite               | Glatte DNA endet für die Ligation mit dem Insert  | 371 – 372        |

**Eigenständigkeitserklärung**

Ich, Eric Engel, erkläre hiermit, dass die vorliegende Bachelorarbeit mit dem Titel „Nachweis porziner Antikörper gegen das Rotavirus-Enterotoxin NSP4“ selbständig verfasst wurde und es zuvor an keiner anderen Hochschule sowie in keinem anderen Studiengang als Prüfungsleistung eingereicht wurde. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet. Alle Stellen der Arbeit, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen oder aus anderweitigen fremden Äußerungen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## **Danksagung**

Auf diesem Wege möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Bachelorarbeit unterstützt und motiviert haben.

An erster Stelle möchte ich Herr Prof. Dr. Junghannß und Herr Prof. Dr. Heun danken, da sie sich als Gutachter für meine Arbeit bereit erklärten.

Weiterhin gebührt mein Dank Prof. Dr. Dr. med vet. Vahlenkamp, der mir die Gelegenheit erst möglich gemacht hat, die Bachelorarbeit am Institut für Virologie zu schreiben. Durch Ihn konnte ich tiefe Einblicke in den Bereich der Virologie gewinnen.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Antje Rückner, die meine Bachelorarbeit betreut und begutachtet hat. Sowohl Theorie als auch neue Praktiken im Labor habe ich durch Sie kennengelernt. Bereits nach einer kurzen Einweisung hat Sie mir so viel Vertrauen entgegengebracht, dass ich diese selbstständig durchführen durfte. Dies weckte nicht nur mein Ehrgeiz, sondern auch das Interesse an dem Thema meiner Bachelorarbeit. Zu letzterem trägt ebenfalls Ihr Enthusiasmus betreffend den Rotaviren bei. Falls doch mal etwas nicht so verlief wie es sollte, zeigte Sie ein hohes Maß an Geduld. Im Falle offener Fragen oder bei Problemen stand Sie mir stets zur Seite.

Ebenfalls möchte ich mich bei Frau Dr. Heenemann und Herr Dr. Sieg bedanken. Bei Fragen konnte ich mich stets an Sie wenden und bekam falls nötig Hilfestellungen oder Ideen zu bestimmten Themen. Sie ermöglichten mir ebenfalls Einblicke in andere Projekte und füllten bzw. erweiterten somit vorhandene Wissenslücken.

Ich möchte mich auch bei meinen Eltern Frank Engel und Mareen Engel, meiner Schwester Eyleen Engel und meinen guten Freund Max Wohlfart bedanken, die mir mein Studium durch Ihre Unterstützung ermöglicht haben bzw. stets ein offenes Ohr für Sorgen hatten.

Auch möchte ich nicht Maxi Harzer unerwähnt lassen. Sie begann zusammen mit mir am Institut für Virologie und bestritt mit mir den gemeinsamen Weg des Lernens. Wir klagten, lachten und verzweifelten zusammen. Trotz manch negativer Erfahrungen, haben die positiven doch stets überwogen.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen des Instituts bedanken, die mich freundlich als den ihren aufgenommen haben.