

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Material**

##### **3.1.1 Versuchstiere**

Für alle Experimente wurden Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*), Klon C25, von der Nagano Experimental Station of Fisheries in Japan verwendet. Dieser homozygote, isogene Regenbogenforellenklon entstand durch Gynogenese über zwei Generationen durch Unterdrückung von Mitose und Meiose. Eine weitere Vermehrung des Klons erfolgte durch Befruchtung klonaler Eier mit Sperma von hormonell vermännlichten Forellen desselben Klons. Die Klonalität wurde durch japanische Partner mittels ‚DNA fingerprinting‘ (nicht gezeigt) nachgewiesen. Der Klon C25 exprimiert das MHC Klasse I-Allel *Onmy-UBA\*501*. Die Fische wurden bei einer Temperatur von 15 °C, in 400 Liter-Tanks in einem semi-rezirkulierenden System gehalten und mit kommerziell erhältlichen Trockenpellets gefüttert. Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung hatten die Forellen ein Alter zwischen 18 und 30 Monaten.

Bei gelegentlich auftretenden Hautirritationen unklarer Genese wurden die Fische symptomatisch mit Acriflavinlösung (5 mg/l) behandelt.

##### **3.1.2 Zellen**

Die Forellenzelllinie RTG-2 (rainbow trout gonade) und die Karpfenzelllinie EPC (epithelioma papulosum cyprini; CCLVRIE 173) wurden von der Zellbank des Friedrich-Loeffler-Institutes (FLI) zur Verfügung gestellt. RTG-2-Zellen exprimieren wie der Forellenklon C25 das MHC Klasse I-Allel *Onmy-UBA\*501* (Dijkstra et al., 2003).

### 3.1.3 Virus

Für alle Experimente wurde der VHSV-Stamm Fi13 (Passage 861) (Enzmann und Bruchhof, 1989) und der IHNV-Stamm G4 (Passage 5) (1992 aus einer Regenbogenforelle in der Präfektur Gifu (Japan) isoliert; nicht veröffentlichte Daten) verwendet.

### 3.1.4 Bakterien, Plasmide

Escherichia coli XL1blue MRF'	Sratogene
pRc/CMV	Invitrogen
pRc/CMV-VG	Dr. Schütze, FLI
pRc/CMV-VN	Dr. Schütze, FLI

### 3.1.5 Antikörper

VHSV-Antiserum vom Kaninchen (polyklonal)	Dr. Schütze, FLI
anti-IHNV-N-mAK	BioX
(VHSV-N-Protein spezifischer monoklonaler Mausantikörper)	
anti-Kaninchen IgG-FITC Konjugat	Sigma
anti-Maus IgG-FITC Konjugat	Sigma
(fluoresceinbeladene monoklonale Mausantikörper)	
POD-konjugierter anti-Maus IgG/IgM Antikörper	Pierce Perbio
biotinylierter anti-Maus IgG (H+L) Antikörper	Vector
mAK IP1D11	Dr. Lorenzen; DFVF
(VHSV-G-Protein spezifischer monoklonaler Mausantikörper; Lorenzen et al., 1988)	
mAK IP5B11	Dr. Lorenzen; DFVF
(VHSV-N-Protein spezifischer monoklonaler Mausantikörper; Lorenzen et al., 1988)	
mAK 4C10	Dr. Köllner; FLI
(Forellen-B-Zell-Antikörper; anti-IgM; Thuvander et al., 1990)	
mAK 42-1	Dr. Köllner; FLI
(Forellen-Thrombozyten-mAK; Köllner et al., 2004)	

mAK Q4E Dr. Köllner; FLI  
 (Forellen-Granulozyten/Monozyten-mAK; Kuroda et al., 2000)

### 3.1.6 Enzyme, Kits

<i>Bam</i> H I	Invitrogen
<i>Hind</i> III	Invitrogen
<i>Not</i> I	Invitrogen
<i>Pst</i> I	Invitrogen
RNasin <sup>®</sup> (RNase Inhibitor)	Promega
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche
EZ-RNA Total RNA Isolation Kit	Biological Industries
Plasmid Maxi Kit <sup>®</sup>	Qiagen
One step RT-PCR Kit	Qiagen
Vectastain <sup>®</sup> Elite ABC Peroxidase Kit	Vector

### 3.1.7 Chemikalien, Reagenzien, Fertiglösungen

3-Amino-9-Ethyl-Carbazol (AEC)	Dako
Agar-Agar	Difco
Aquatex	Merck
Ammoniumsulfat	Roth
Ampicillin	Sigma
Bacto Trypton	Difco
Bacto Hefeextrakt	Difco
Benzocain	Sigma-Aldrich
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma
Bromphenolblau	Sigma
Chloralhydrat	Roth
Coomassie Brilliant Blau R250	Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliant Blau G250	Sigma-Aldrich

1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO)	Sigma-Aldrich
Diethylcarbonat (DEPC)	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat	Roth
Eisessig (Essigsäure > 95 %)	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich
Ethanol (Rotipuran®)	Roth
Essigsäure	Merck
Fötiales Kälberserum (FKS)	Gibco
Folin-Ciocalteu's Phenol-Reagenz	Sigma-Aldrich
Formaldehyd (37 %)	Roth
FuGENE 6 Transfection Reagent	Roche
Glyzerin, wasserfrei	Roth
Hämatoxylin	Sigma
Ham's F12 Nutrient Mixture	Gibco
Insulin-Transferrin-Natriumselenit (Supplement)	Sigma
Iscove's (Modifiziertes Dulbecco's Medium, Pulver)	Gibco
Isopropanol (2-Propanol)	Roth
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Kaliumalaun (Kaliumaluminiumsulfat)	Roth
Kupfersulfat Pentahydrat	Roth
MEM (Eagle) mit Hank's-Salzen	Gibco
MEM (Eagle) mit Earl's-Salzen	Gibco
Mercaptoethanol	Roth
Methanol	Roth
Natriumcarbonat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumiodat	Sigma-Aldrich
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Roth
Natriumhydrogencarbonat	Roth
Natriumhydroxid	Roth

Natriumpyruvat	Roth
Paraffin (Histosec)	Merck
Percoll-Lösung (isoton; 1,124g/cm <sup>3</sup> )	Biochrom
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20)	Roth
n-Propanol (1-Propanol)	Roth
Propidiumiodid	Roth
o-Phenylendiamin (OPD)	Roth
Roti <sup>®</sup> -Blocklösung	Roth
Roti <sup>®</sup> -Histol	Roth
D(+)-Saccharose, reinst	Roth
Salzsäure (konz.)	Roth
Supplement (Insulin-Transferrin-Natriumselenit)	Sigma
Tätowiertusche	Raidex
N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin (TEMED)	Roth
Tetrazyklin (hydrochlorid)	Sigma
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Invitrogen
Trypanblaulösung	Sigma
Trypsin	Roth
Wasserstoffperoxid 30 %	Roth
Zitronensäure-Monohydrat	Sigma-Aldrich
Zitronensäure	Serva

### 3.1.8 Lösungen, Puffer, Medien

#### 3.1.8.1 Lösungen

##### Ampicillin-Stammlösung

25 mg/ml Ampicillin in Aqua dest.

##### Benzocain-Lösung (Narkosebad)

0,5 g Benzocain in 5 ml Ethanol (Stammlösung)

davon 1 ml in 1 l Wasser

Coomassie-Färbelösung

2 g Coomassie Brilliant Blau R250  
0,5 g Coomassie Brilliant Blau G250  
425 ml Ethanol  
20 ml Methanol  
100 ml Essigsäure  
425 ml Aqua dest.

Elisa-Substratlösung (OPD in Phosphat-Zitrat-Puffer)

5,14 ml Lösung A (0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat)  
4,86 ml Lösung B (0,1 M Zitronensäure)  
1 OPD-Tablette (4 mg)  
kurz vor Gebrauch 10 µl Wasserstoffperoxid 30 %

Hämalaun nach Mayer

1 g Hämatoxylin in 1000 ml Aqua dest. lösen  
200 mg Natriumiodat und 50 g Kaliumalaun (Lösung blauviolett)  
50 g Chloralhydrat und 1 g Zitronensäure (Farbumschlag zu violett)

Lowry-Reagenz

5 ml Lösung A (100 g Natriumcarbonat in 1000 ml 0,5 M Natriumhydroxidlösung)  
250 µl Lösung B (1 g Kupfersulfat-Pentahydrat in 100 ml Aqua dest.)  
250 µl Lösung C (2 g Kaliumtartrat-Tetrahydrat in 100 ml Aqua dest.)

PAGE-Entfärber

7 % Essigsäure

4 % Phosphat-gepuffertes Formalin (pH 7,3)

4 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat  
6,5 g Dinatriumhydrogenphosphat  
900 ml Aqua dest.  
100 ml Formaldehyd (37 %)

SDS-PAGE Sammelgel

500 µl Acrylamid 30 %  
380 µl 1,5 M Tris (pH 8,8)  
30 µl SDS (10 %)  
30 µl Ammoniumsulfat (10 %)  
3 µl TEMED  
2,1 ml Aqua dest.

SDS-PAGE Trenngel 12 %

4,0 ml Acrylamid 30 %  
2,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8)  
100 µl SDS (10 %)  
100 µl Ammoniumsulfat (10 %)  
4 µl TEMED  
3,3 ml Aqua dest.

Tetrazyklin-Stammlösung

12,5 mg Tetrazyklin in 1 ml Ethanol lösen

Trypsinlösung

136 mM Natriumchlorid  
2,6 mM Kaliumchlorid  
8 mM Natriumdihydrogenphosphat  
1,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat  
3,3 mM EDTA  
0,125 % Trypsin

Wasserstoffperoxid / Methanol-Lösung

1,5 ml Wasserstoffperoxid 30 %  
90 ml Methanol

### **3.1.8.2 Puffer**

#### ELISA-Adsorptionspuffer

3 g Natriumhydrogencarbonat  
Aqua dest. ad 1000 ml  
mit Natriumcarbonat auf pH 8,6 einstellen

#### ELISA-Waschpuffer

0,5 ml Tween 20  
1000 ml PBS<sup>-</sup>

#### Fluoreszenzerhaltungspuffer

2,5 g 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO)  
90 ml Glycerol  
10 ml PBS<sup>-</sup> (im 37 °C Wasserbad lösen)  
pH 8,6 (mit HCl)  
Propidiumiodid 1:1000

#### PAGE-Laufpuffer

3,02 g Tris  
18,775 g Glyzerin  
0,1 g SDS  
Aqua dest. ad 1000 ml

#### PAGE-Probenpuffer

1,51 g Tris  
20 ml Glyzerin  
35 ml Aqua dest.  
pH 6,7 (mit Salzsäure)  
4 g SDS  
10 ml Mercaptoethanol  
2 mg Bromphenolblau  
Aqua dest. ad 100 ml



PBS<sup>-</sup> (phosphate buffered saline; Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)

8 g Natriumchlorid  
1,44 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat  
(oder 2,9 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat)  
0,2 g Kaliumdihydrogenphosphat  
0,2 g Kaliumchlorid  
Aqua dest. ad 1000 ml; pH 7,2

Probenpuffer für Agarosegelelektrophorese

0,25 % Bromphenolblau  
0,25 % Xylencyanol FF  
30 % Glyzerin  
in Aqua dest. lösen

TAE (Tris-acatate-EDTA) (50x)

242 g Tris  
57,1 ml Eisessig  
100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)  
Aqua dest. ad 1000 ml  
(20 ml ad 1000 ml Aqua dest. = 1x TAE)

TBS (Tris buffered saline)

6,1 g Tris  
0,8 g Natriumchlorid  
500 ml Aqua dest.  
mit Salzsäure (konz.) pH 7,65 einstellen  
Aqua dest. ad 1000 ml

TNE (Tris-NaCl-EDTA)

0,02 M Tris  
0,005 M EDTA  
0,1 M Natriumchlorid  
1000 ml Aqua dest.  
pH 8,6 (mit Salzsäure)

Zitratpuffer (10 mM; pH 6)

2,1 g Zitronensäure-Monohydrat  
900 ml Aqua dest.  
pH 6 (mit 2 M Natriumhydroxidlösung)  
Aqua dest. ad 1000 ml

**3.1.8.3 Medien**

LB (Luria-Bertani)-Medium

10 g Bacto Trypton  
5 g Bacto Hefeextrakt  
5 g Natriumchlorid  
Aqua dest. ad 1000 ml  
pH 7,5 (mit 1 M Natriumhydroxidlösung)

LB-Agar

LB-Medium mit 1,5 % Agar

Mischmedium (MM)

Ham's F12 Nutrient Mixture und  
Iscove's Modifiziertes Dulbecco's Medium      1:1  
2,1 g/l Natriumhydrogencarbonat  
10 % FKS  
pH 7,2 - 7,4

serumfreies (sf) MM

siehe MM  
ohne FKS  
pH 7,2 - 7,4

BSA-Mischmedium (BSA-MM)

Ham's F12 Nutrient Mixture und

Iscove's Modifiziertes Dulbecco's Medium 1:1

2,1 g/l Natriumhydrogencarbonat

0,2 % BSA

Supplement (Insulin-Transferrin-Natriumselenit) (1 vial/5 l)

pH 7,2 - 7,4

MEM (Minimal Essential Medium) 5

MEM (Eagle) mit Hank's-Salzen und

MEM (Eagle) mit Earl-Salzen 1:1

1,25 g/l Natriuhydrogencarbonat

120 mg/l Natriumpyruvat

10 % FKS

pH 7,2 - 7,4

MEM (Minimal Essential Medium) 21

MEM (Eagle) mit Hank's-Salzen

850 mg/l Natriuhydrogencarbonat

10 % FKS

pH 7,2 - 7,4

Percoll-Lösung Dichte 1,075 g/cm<sup>3</sup>

57,8 ml Percoll

42,2 ml sf MM

**3.1.9 Geräte**

Brutschrank B6

CO<sub>2</sub>-Brutschrank CMI300VBA

Digitalkamera CAMEDIA C-3040ZOOM

Durchflusszytometer

Elisa-Reader

Heraeus

Nunc

Olympus

Becton Dickinson

BioRad

Fluoreszenz Mikroskop IX50	Olympus
Floureszenzeinrichtung IX-RFAC	Olympus
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad
Inkubationsschüttler CC25KC	New Brunswick Scientific
Labor-Zentrifuge Universal 30RF	Hettich
Labor-Zentrifuge 5424	Eppendorf
Microtom 340 E	Leica
Mikrowelle	Privileg
Mx 3000P real-time PCR cyler	Stratagene
pH-Meter	Knick
Phasenkontrastmikroskop	Zeiss
Pipetten	Eppendorf, Abimed
Präzisionswaage	Sartorius
Rotoren für Ultrazentrifugen	Beckman, Kontron
Sicherheitswerkbank	Heto-Holten
Thermocycler PTC-200	Biometra, Dtl.
Ultrazentrifugen	Beckmann, Kontron
Vortex Reax	Heidolph
Thoma-Zählkammer	Feinoptik, Bad Blankenburg

### 3.1.10 Verbrauchsmaterialien

Pipettenspitzen	Eppendorf, Sarstedt
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Sarstedt
Zellkulturflaschen (T25, T75)	Corning
Zellkultur-Flachbodenplatten (24, 48, 96 Kavitäten)	Costar
Zentrifugenröhrchen	Beckmann
Objektträger Superfrost plus®	Menzel-Gläser
Glaspipetten	Brand
Elisa-Mikrotiterplatten	Nunc
Petrischalen	Costar

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Zellkultur und Virusanzucht**

#### **3.2.1.1 Kultivierung von Fischzellen**

Die Zelllinien RTG-2 und EPC wurden in MM bzw. MEM 5 bei 20 °C und 2,5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Alle 7-10 Tage wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Medium entfernt und die Zellen mit Trypsinlösung inkubiert, bis sie sich vom Zellkulturflaschenboden ablösten. Die Zellen wurden in frischem Zellkulturmedium resuspendiert und im Verhältnis 1:2 (RTG-2) bzw. 1:6 (EPC) auf neue Kulturflaschen gleicher Wachstumsfläche aufgeteilt.

Für die Transfektion vorgesehene EPC-Zellen wurden fortlaufend bei 26 °C und 2,5 % CO<sub>2</sub> kultiviert und alle 10 Tage 1:6 bis 1:8 umgesetzt.

#### **3.2.1.2 Vermehrung VHSV**

Zur Virusanzucht wurde die Zelllinien EPC verwendet. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:3 auf Flaschen mit 75 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche (T75) bis zu einer 80 %igen Konfluenz bei 20 °C inkubiert. Vier bis sechs Stunden vor dem Beimpfen mit Virus wurden die Zellen nochmals im Verhältnis 1:1 umgesetzt. Nach Entfernen des Mediums und einmaligem Waschen mit sterilem PBS<sup>-</sup> wurden jeweils 3ml Virussuspension (MOI ca. 0,1) pro T75-Flasche inokuliert. Nach einer Stunde Inkubationsdauer (Virusadsorption) bei 15 °C unter mehrmaligem Bewegen wurde mit Medium auf ein Endvolumen von 15 ml aufgefüllt und bis zu einem 80 %igen cytopathogenen Effekt (CPE) bei 15 °C kultiviert. In diesem Infektionsstadium wurden die Kulturen bei -20 °C eingefroren. Nach Auftauen wurde die virushaltige Suspension mit 2000 x g, 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, portioniert und bei -70 °C gelagert.

### 3.2.1.3 Virustitration

Die quantitative Bestimmung der Infektiosität einer Virussuspension erfolgte durch die Titration auf entsprechenden Zelllinien. Die Zellkultur wurde von einer T25-Zellkultur-Flasche auf eine 96-Kavitäten-Zellkulturplatte ausgesät und über Nacht im CO<sub>2</sub>-Brutschrank kultiviert. Von der Virussuspension wurde eine Verdünnungsreihe in log<sub>10</sub> Schritten (von 10<sup>-1</sup> bis 10<sup>-10</sup>) in entsprechendem Medium hergestellt, wobei jeweils 50 µl Virussuspension auf 450 µl Medium übertragen wurden. Nach Abnahme der Zellkulturmediums wurden jeweils 50 µl der entsprechenden Verdünnung in jeweils acht untereinander liegende Kavitäten gegeben: Reihe 1 - Virussuspension unverdünnt (10<sup>0</sup>), Reihe 2 bis 11 - Verdünnungsstufen 10<sup>-1</sup> bis 10<sup>-10</sup>, Reihe 12 - nur Medium. Diese Platte wurde dann solange bei 15 °C inkubiert, bis sich die Anzahl der virusbefallenen Kavitäten (sichtbar am CPE) nicht mehr veränderte.

Die Berechnung des Virustiters erfolgte mit der Methode nach Spearman und Kaerber (Mayr und Bachmann, 1997) und wurde als KID<sub>50</sub>/ml (kulturinfektiöse Dosis 50 % = diejenige Verdünnung, bei der noch die Hälfte der Kavitäten infiziert sind) Virussuspension angegeben.

### 3.2.2 Plasmid-DNA: pRc/CMV, pRc/CMV-VG, pRc/CMV-VN

Plasmide sind ringförmige doppelsträngige DNA-Moleküle, die dazu benutzt werden, bestimmte Gene zu vervielfältigen (Klonierungsvektoren) oder zu exprimieren (Expressionsvektoren). Diese Vektoren tragen ein oder mehrere Antibiotikaresistenz-Gene und können in Bakterien durch Antibiotika-Selektion vermehrt werden.

Die Sequenzen, kodierend für das Glykoprotein beziehungsweise Nukleokapsidprotein des VHSV (Stamm Fi 13), wurden unter Verwendung der Schnittstellen für die Enzyme Hind III und Not I in den eukaryotischen Expressionsvektor pRc/CMV (CMV-Promotor; vermittelt Ampicillin-Resistenz) kloniert. Diese Arbeiten wurden von Frau Dr. Heike Schütze (Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Insel Riems, Institut für Infektionsmedizin) durchgeführt.

Plasmidnomenklatur: pRc/CMV-VG (kodiert für das Glykoprotein des VHSV), pRc/CMV-VN (kodiert für das Nukleokapsidprotein des VHSV) und pRc/CMV (Originalplasmid ohne Insert; diente als Kontrolle).

### **3.2.2.1 Vermehrung**

#### **3.2.2.1.1 Herstellung transformationskompetenter *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterien**

Bakterienzellen wurden nach der Calciumchlorid-Methode mit 0,1 M Calciumchloridlösung behandelt, wodurch die Membran permeabel für Plasmid-DNA wird. Hierzu wurde der *E. coli*-Stamm „XL1blue MRF“ verwendet, welcher ein Tetrazyklinresistenzgen enthält.

Beschreibung: Nach einem Verdünnungsausstrich der *E. coli*- Ausgangskultur (XL1blue MRF) auf einer LB-Agarplatte (+Tetrazyklin) und Inkubation bei 37 °C wurde eine Einzelkultur über Nacht in LB-Medium (ohne Antibiotikum) bei 37 °C im Schüttelinkubator bebrütet. Diese Bakteriensuspension wurde 1:100 in LB-Medium (+Tetrazyklin) verdünnt (30 ml Endvolumen) und bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte (bei 600 nm) von 0,4 - 0,5 inkubiert. Die Kultur wurde abzentrifugiert (2000 x g, 4 °C, 10 min), das Pellet in 15 ml 4 °C kalter Calciumchloridlösung (100 mM) resuspendiert und 20 min auf Eis gestellt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 1,5 ml 4 °C kalter Calciumchloridlösung resuspendiert und entweder sofort zur Transformation eingesetzt oder mit 15 % Glycerin versetzt, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -70 °C gelagert.

#### **3.2.2.1.2 Transformation von kompetenten *E. coli* Bakterien mit Plasmid-DNA**

Als Transformation bezeichnet man das Einschleusen von DNA in eine Bakterienzelle.

50 µl kompetente *E. coli* „XL1blue MRF“ wurden mit 50 ng Plasmid-DNA 30 min auf Eis, 2 min bei 42 °C und 2 min auf Eis inkubiert. Diese Suspension wurde in 1 ml LB-Medium für eine Stunde bei 37 °C geschüttelt. Danach wurden 100 µl dieser

Suspension auf einer Agarplatte (100 µg/ ml Ampicillin) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Eine Kolonie dieses Transformationansatzes wurde dann jeweils zur Vermehrung der Plasmid-DNA verwendet.

Als Kontrolle wurde bei jeder Transfektion eine Lösung von kompetenten Bakterien ohne Plasmid-DNA nach demselben Schema mitgeführt. Auf dieser Agarplatte wuchsen wegen der fehlenden Antibiotikaresistenz keine Bakterien.

### **3.2.2.1.3 Plasmid-DNA-Präparation in großem Maßstab (Maxi-Präparation)**

Zur Gewinnung größerer Mengen reiner Plasmid-DNA wurde die Methode der alkalischen Hydrolyse unter Verwendung des Qiafilter™ Plasmid Maxi Kits der Firma Qiagen eingesetzt.

Je 200 µl einer vorkultivierten, plasmidtragenden Bakteriensuspension wurden in 200 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) über Nacht bei 37 °C unter Schütteln vermehrt. Anschließend wurden die Bakterien abzentrifugiert (3200 x g), der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 10 ml Puffer 1 gründlich resuspendiert (Lyse der Bakterien durch SDS). Nach Zugabe von 10 ml Puffer 2 (alkalische Denaturierung der DNA) und einer Inkubation für maximal 5 min bei Raumtemperatur wurden 10 ml gekühlter Puffer 3 zugegeben (Neutralisierung durch Kaliumacetat: Präzipitation von denaturierten Proteinen, chromosomaler DNA, hochmolekularer RNA; niedermolekulare Plasmid-DNA bleibt in Lösung), vorsichtig durchmischt und in eine Qiafilter Filterkartusche überführt (DNA enthält oberhalb pH 2 negativ geladene Phosphatgruppen). Nach 10minütiger Inkubation wurde durch die Filterkartusche ein klares Filtrat abgepresst und auf die zuvor mit 10 ml QBT Puffer äquilibrierte QIAGEN tip 500-Säule (Anionenaustauschersäule mit positiv geladenen Gruppen) geladen. Nach zweimaligem Waschen der Säule mit je 30 ml QC Puffer (höhere Ionenstärke → RNA wird entfernt) wurde die Plasmid-DNA mit 15 ml QF Puffer (noch höherer Ionenstärke) eluiert, anschließend mit 0,7fachem Volumen Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt und abzentrifugiert (3200 x g, 30 min, 4 °C). Das Pellet wurde mit 5 ml Ethanol 70 % gewaschen und nach Trocknung sofort in 100-200 µl PBS<sup>-</sup> aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch (260 nm) bestimmt. Nach Einstellung der Suspension auf eine Endkonzentration von 1 µg/µl mit PBS<sup>-</sup> wurde diese bis zur Applikation bei -20 °C gelagert.



### 3.2.2.2 Überprüfung der Plasmid-DNA

#### 3.2.2.2.1 Restriktion

Die Plasmid-DNA wurde durch Verdau mit geeigneten Restriktionsendonukleasen in der Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Der Standardansatz enthielt folgende Bestandteile: 0,2 µg Plasmid-DNA, 1 µl Reaktionspuffer (10x), 2 U (unit) Restriktionsenzym(e) (Tab. 2) und destilliertes Wasser (A. dest) ad 10 µl. Die Restriktionsansätze wurden 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 2 µl Probenpuffer (5x) wurden die Spaltprodukte in einem 0,8 %igen Agarosegel (Agarose in TAE mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid) in einer horizontalen Gelelektrophorese aufgetrennt (400 mA; 80 V; 1,5 h). Als Längenstandard diente ein 1 kbp-Marker (New England Biolabs). Die Detektion erfolgte unter UV-Licht (256 nm).

**Tab. 2:** Zusammenstellung aller verwendeten Restriktionsenzyme und die Größe der entsprechenden Spaltprodukte (bp = Basenpaare).

Plasmid-DNA Größe in bp	Hind III / Not I Spaltprodukte in bp	Pst I Spaltprodukte in bp	Bam HI Spaltprodukte in bp
pRc/CMV 5446	5370 76	4059 1387	3102 1969 375
pRc/CMV-VG 6922	5369 1553	4175 2747	3089 1969 1864
pRc/CMV-VN 6583	5358 1225	4507 2076	4614 1969

#### 3.2.2.2.2 Transfektion von Fischzellen

Die Transfektion ist ein DNA-vermittelter Gentransfer. Im Gegensatz zur Transformation, bei der ein DNA-Transfer in Bakterienzellen erfolgt, dient die Transfektion dem Einbringen von Nukleinsäure in eukaryotische Zellen.

Um zu überprüfen, ob die rekombinanten Proteine G und N in Fischzellen exprimiert werden, wurden die Plasmide pRc/CMV-VG oder pRc/CMV-VN unter Verwendung des FuGENE® Transfektionsreagenz in Fischzellen transfiziert.

Bei 26 °C vorkultivierte EPC Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion auf 48-Kavitäten-Zellkulturplatten umgesetzt. Die semikonfluenten EPC-Zellen wurden vor der Transfektion eine Stunde mit serumfreiem MM kultiviert. Die Transfektionslösung, bestehend aus 23 µl serumfreiem MM, 0,5 µl Plasmid-DNA (1 µg/µl) und 1,5 µl FuGENE Reagenz wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und nach Entfernen des Mediums von den Zellen direkt auf den Zellrasen getropft und anschließend mit 200 µl serumfreiem Medium aufgefüllt. Nach einer zweistündigen Inkubation im Brutschrank (26 °C) erfolgte die Zugabe von 225 µl MM und nach weiteren 2 bis 4 Stunden im Brutschrank wurde ein Mediumwechsel zu MEM 5 vorgenommen. Nach drei bis vier Tagen Kultivierung wurde der Zellrasen mit Aceton/Methanol (1:1; -20 °C) fixiert und für die immunfluorimetrische Auswertung gefärbt. Dazu wurden die Zellen 30 min mit einem VHSV – Antiserum (Kaninchen) inkubiert, gewaschen, 30 min mit einem anti-Kaninchen IgG-FITC Konjugat markiert und nach erneutem Waschen mit Fluoreszenzerhaltungspuffer eingedeckt. Als Kontrollen dienten Zellen, die mit Plasmid-DNA ohne Insert (pRc/CMV) transfiziert worden waren. Die Auswertung erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie.

### **3.2.3 Manipulationen am Tier**

#### **3.2.3.1 Immunisierung der Forellen mit Plasmid-DNA**

Regenbogenforellen wurden in einer Benzocain-Lösung anästhesiert und erhielten jeweils 4 räumlich versetzte Injektionen von jeweils 20 µl DNA-Lösung (1 µg/µl in PBS<sup>-</sup>) in den dorsalen Muskel (0,4 mm Kanüle) und eine rektale Applikation von 50 µl DNA-Lösung (1 µg/µl) mittels Knopfkanüle. Kontrolltieren wurden entsprechende Mengen an PBS<sup>-</sup> oder Kontroll-DNA (pRc/CMV; ohne Insert; 1 µg/µl) verabreicht. Die vakzinierten Fische wurden in Gruppen von bis zu 30 Tieren gehalten. Die Immunisierungen wurden nach folgendem zeitlichen Schema vorgenommen: drei Applikationen im Abstand von 21 Tagen; CMC-Test 7 Tage nach der letzten Verabreichung.

### 3.2.3.2 Nachweis der Proteinexpression am Applikationsort

Die Forellen wurden wie oben beschrieben einmalig i.m. mit Plasmid-DNA immunisiert. Um die Injektionsstelle genauer zu markieren, wurde der DNA-Lösung eine geringe Menge Tätowiertusche (im Verhältnis 1:100000) zugefügt. 22 Tage nach der Immunisierung wurden die Tiere betäubt und getötet. Muskelgewebeproben wurden vom Applikationsort entnommen, in 4 % Phosphat-gepuffertem Formalin fixiert und in Paraffin-Paraplast (Histosec) eingebettet.

Von den in Paraffin eingebetteten Muskelgewebeproben wurden 4 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Die Schnitte wurden erst in Rotihistol (2 x 5 min), n-Propanol (2 x 3 min) und dann in einer absteigenden Alkoholreihe (96 %, 80 %, 70 %, 50 %, 25 %; je 3 min) entparaffiniert. Zelluläre Peroxidasen wurden durch Inkubation mit einem Wasserstoffperoxid/Methanol-Gemisch blockiert. Nach vollständigem Durchlaufen der absteigenden Alkoholreihe wurde zweimal in TBS gewaschen. Zur Demaskierung des zu bestimmenden Proteins wurden die Objektträger in Zitratpuffer zweimal für 5 min in der Mikrowelle (600 Watt) erhitzt. Nach dreimaligem Waschen in TBS wurden die Schnitte zur Blockierung von unerwünschten Bindungsstellen 30 min in einer 5 %igen BSA-Lösung (in PBS<sup>-</sup>) inkubiert. Der immunhistochemische Nachweis der Virusproteine erfolgte nach der ABC-Methode (ABC = Avidin/Biotinylated Enzyme Complex) (Hsu et al., 1981) mittels Vectastain® Elite ABC Kit. Der Primärantikörper wurde für 1 h aufgetragen: mAK IP1D11 zum Nachweis des VHSV G-Proteins; mAK IP5B11 zum Nachweis des VHSV N-Proteins (Verdünnung jeweils 1:100). Nach dreimaligem Waschen mit TBS erfolgte die Zugabe eines biotinylierten Sekundärantikörpers (anti-Maus; Vector; Verdünnung 1:100) für 30 min. Gleichzeitig wurde der Komplex aus Avidin und dem biotinylierten Enzym (Meerrettich-Peroxidase) (ABC-Lösung) angesetzt. Nach dreimaligem Waschen in TBS und Inkubation (30 min) mit der frisch vorbereiteten ABC-Lösung wurden die Schnitte erneut gewaschen und mit dem chromogenen Substrat AEC gefärbt. Nach 5-10 min wurde die enzymatische Reaktion durch Waschen mit Aqua dest. gestoppt. Die Schnitte wurden dann mit Mayer's Hämatoxylin 2 min gegengefärbt, in Leitungswasser gebläut, mit Aqua dest. gespült und mit Aquatex® eingedeckt. Die Auswertung und Dokumentation erfolgte an einem konventionellen Lichtmikroskop mit Digitalkamera.

### 3.2.3.3 Infektion der Forellen, Probennahme

Regenbogenforellen wurden in Benzocain-Lösung anästhesiert und erhielten jeweils eine intraperitoneale (i.p.) Injektion von  $1 \times 10^4$  KID<sub>50</sub> in 100 µl MEM 5 und eine rektale Applikation von  $1 \times 10^3$  KID<sub>50</sub> in 100 µl MEM 5. Drei, zehn und 16 Tage nach Infektion (d p.i.) wurden jeweils vier Fische getötet und durch Punktion der Schwanzvene mit einer nicht heparinisierten Spritze 400-800 µl Blut entnommen. Danach wurden die Tiere mit einer heparinisierten Spritze vollständig entblutet und durch Kopfschlag getötet. Eine Zweitinfektion der verbliebenen Forellen nach demselben Schema der Infektion und Probennahme erfolgte 22 d p.i..

Den Kontrolltieren wurde statt einer Virussuspension eine äquivalente Menge MEM 5 verabreicht.

Die nicht heparinisierten Blutproben wurden nach erfolgter Gerinnung zur Entfernung der partikulären Bestandteile abzentrifugiert. Die Lagerung der Serumproben erfolgte bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.4 Zytotoxizitätsassay

Bei der *in vitro* Messung der zytotoxischen Aktivität von Lymphozyten werden Zielzellen (Targetzellen) zusammen mit potentiellen Effektorzellen inkubiert. Nach einer festgelegten Zeitspanne wird bestimmt, wie viele Zielzellen von den Effektorzellen lysiert wurden. Das Prinzip beruht auf der Quantifizierung von Markersubstanzen, die nach dem Tod der Targetzelle in den Zellkulturüberstand abgegeben werden. Solche Markersubstanzen werden entweder artifiziell in das Zytosol der Targetzelle eingebracht oder liegen bereits in der Zelle vor.

Zur Ermittlung der zellvermittelten Zytotoxizität wurde in dieser Arbeit die Abgabe des zytosolischen Enzyms Lactat-Dehydrogenase (LDH) durch ein kolorimetrisches Testverfahren bestimmt (Babson & Babson, 1973; Decker & Lohmann-Matthes, 1988). LDH ist ein Enzym, welches in großen Mengen im Zytosol vorhanden ist und als Oxidoreduktase die Übertragung von Wasserstoff katalysiert. Es ist sehr stabil in Kulturmedien und resistent gegen den Abbau durch Proteasen. LDH katalysiert die Oxidation von Lactat zu Pyruvat mit gleichzeitiger Reduktion von  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH} + \text{H}^+$ . Diese Enzymaktivität lässt sich in einer zweiten Enzymreaktion quantifizieren, bei

der das Enzym Diaphorase die Reduktion von einem farblosen Tetrazoliumsalz zu einem roten Formazansalz katalysiert (bei gleichzeitiger Oxidation von  $\text{NADH} + \text{H}^+$  zu  $\text{NAD}^+$ ). Die photometrisch detektierte Menge des gebildeten Formazans ist direkt proportional zur LDH-Aktivität und korreliert mit der Anzahl getöteter Zellen.

#### **3.2.4.1 Präparation der Targetzellen**

Die Präparation der Targetzellen erfolgte jeweils einen Tag vor dem Testansatz. RTG-2- und EPC-Zellen wurden vier bis sechs Tage nach der letzten Passage zu je  $2 \times 10^4$  Zellen/Kavität auf 96-Kavitäten-Flachboden-Zellkulturplatten ausgesät und bei  $20^\circ\text{C}$  kultiviert. Etwa 12 beziehungsweise 8 Stunden später wurde die Hälfte der auf einer Platte befindlichen Targetzellen mit VHSV beziehungsweise IHNV infiziert und bis zum Testbeginn bei  $15^\circ\text{C}$  inkubiert (etwa 12 beziehungsweise 16 Stunden).

#### **3.2.4.2 Ermittlung der für die Targetzellinfektion nötigen Virusmenge (Immunfluoreszenz)**

Die Virusmenge, die nötig war, um annähernd 100 % der Targetzellen zu infizieren, wurde fortlaufend jeweils vor jedem neuen Versuchsansatz bestimmt. Dazu erfolgte die Aussaat von je  $2 \times 10^4$  Zellen/Kavität auf 96-Kavitäten-Flachboden-Zellkulturplatten, eine etwa zwölfstündige Kultivierung der Zellen bei  $20^\circ\text{C}$  und nachfolgende Infektion mit unterschiedlichen Virusmengen. Die infizierten Zellen wurden etwa zwölf Stunden bei  $15^\circ\text{C}$  inkubiert, danach mit Aceton/Methanol (1:1) fixiert und konsekutiv mit einem anti-VHSV Kaninchenserum und einem anti-Kaninchen FITC-markierten Sekundärantikörper beziehungsweise anti-IHNV-N-mAk (BioX) und einem anti-Maus FITC-markierten Sekundärantikörper angefärbt. Die Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop.

### 3.2.4.3 Präparation von PBL (Effektorzellen)

Das Blut getöteter Forellen wurde unverzüglich mit dem fünffachen Volumen 4 °C kalten BSA-MM verdünnt. 3 ml einer Percoll-Lösung (Dichte von 1,075 g/cm<sup>3</sup>) wurden mit 6 ml des verdünnten Blutes überschichtet und mit 650 x g bei 4 °C für 40 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die auf der Gradientenschicht verbliebenen Zellen mit einer Glaspipette abgenommen, einmal mit BSA-MM gewaschen (400 x g, 4 °C, 10 min) und gezählt. Die separierten Zellen enthielten Lymphozyten, Monozyten, neutrophile Granulozyten, Thrombozyten, gelegentlich geringe Mengen an Erythrozyten und einige tote Zellen. Letztere färbten sich wegen einer geschädigten permeablen Zellmembran bei der Zellzählung in Trypanblaulösung blau an. Die Gesamtzahl der für die Zytotoxizitätsassays zur Verfügung stehenden Zellen wurde anhand der Gesamtzahl der gezählten lebenden Leukozyten ermittelt (PBL-Kapazität).

Vor der Verwendung im Zytotoxizitätstest wurden die PBL in 3 Verdünnungsschritten jeweils 1:2 fortlaufend verdünnt.

### 3.2.4.4 PBL-Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 50 µl einer Zellsuspension (PBL, Kulturzellen) mit 50 µl Trypanblaulösung gemischt (Vorverdünnung 1:2) und in einer Thoma Zählkammer unter dem Phasenkontrastmikroskop gezählt. Auf einer Thoma Zählkammer befinden sich 16 Gruppenquadrate mit einem Flächeninhalt von jeweils 0,04 mm<sup>2</sup>. Die Kammertiefe beträgt 0,1 mm. Daraus ergibt sich ein Rauminhalt von 0,004 mm<sup>3</sup> je Gruppenquadrat. Die Zellanzahl in fünf Gruppenquadraten wurde bestimmt, was einem Rauminhalt von 0,02 mm<sup>3</sup> entspricht. Um auf einen Rauminhalt von 1 cm<sup>3</sup> (entsprechend 1 ml; 1 cm<sup>3</sup> = 1.000 mm<sup>3</sup>) umzurechnen, musste diese Zellanzahl folglich mit 50.000 multipliziert werden. Da die Zehlsuspension 1:2 vorverdünnt wurde, musste die erhaltene Zellzahl weiterhin noch mit dem Faktor 2 multipliziert werden.

Vereinfacht dargestellt: Zellzahl/ml = Zellzahl in 5 großen Quadraten x 10<sup>5</sup>.

Nach Bestimmung der Gesamtzellzahl wurden die Zellen schonend pelletiert und durch Verdünnen im entsprechenden Medium auf die gewünschte Zellkonzentration eingestellt.

### 3.2.4.5 Zeitlicher Ablauf des Zytotoxizitätstests

**Tab. 3:** Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs eines Zytotoxizitätstests (Endvolumina/ Kavität 200 µl)

Zeitachse	
-24h	- Aussaat der Targetzellen RTG-2, EPC; $2 \times 10^4$ / Kavität (je 200 µl) - Brutschrank 20 °C, 2,5 % CO <sub>2</sub>
-12h (-16h)	- Infektion der Targetzellen mit VHSV (beziehungsweise IHNV) - Brutschrank 15 °C, 2,5 % CO <sub>2</sub>
-4h	- Ausbluten der immunisierten bzw. infizierten Forellen (maximal vier pro Tag) - Separation der PBL, Zellzahlbestimmung, Einstellung
0h	- Mediumwechsel auf den Targetzellen zu BSA-MM (100 µl/ Kavität) - Titration der PBL (Ausgangssuspension und 3 Verdünnungsstufen) - Zugabe der PBL (100 µl/ Kavität) zu den Targetzellen (infiziert und nicht infiziert) → <u>Testbeginn</u>
+3,5h	- Zugabe von 10 µl Triton X 100 (10 %) zu drei von sechs Targetzellkavitäten (zur Bestimmung des 100 % LDH-Abgabe-Wertes) und zu drei von sechs Mediumkavitäten (Volumenkorrektionskontrolle)
+4h	- Resuspension auf Schüttler, Anzentrifugieren, Abnahme der Überstände (je 100 µl) und Übertragung auf ELISA-Platten, Zugabe von Reagenzlösung (Iodotetrazoliumchlorid/ Natriumlactat + Diaphorase/ NAD <sup>+</sup> ; 100 µl/ Kavität) zur Bestimmung des LDH-Gehaltes - Inkubation im Dunkeln für circa 30 min
	- Detektion der Farbreaktion am ELISA-Reader bei 492 nm

Eine 96-Kavitäten-Platte eines Versuchsansatzes, bei dem aufgrund der PBL-Gesamtzahl ein maximales Effektor-/Targetzell-Verhältnis (E/T-Ratio) von 100 zu 1 (das bedeutet:  $2 \times 10^6$  PBL werden mit  $2 \times 10^4$  RTG-2 beziehungsweise EPC kultiviert) erreicht wurde, ist in Tabelle 3a dargestellt. Durch Titration in zweier Stufen ergeben sich weitere E/T-Ratios von 50:1, 25:1 und 12,5:1. Die Targetzellen auf dem rechten Teil der Platte sind mit Virus infiziert, die Zellen auf dem linken Teil nicht infiziert.

#### **3.2.4.6 Berechnung der prozentualen Zytotoxizität**

Die Bestimmung der LDH-Abgabe wurde mit einem Testkit (Cytotoxicity Detection Kit LDH) der Firma Roche durchgeführt. Die Gebrauchsanweisung schreibt das Anlegen folgender Test- und Kontrollkavitäten vor:

- Experiment (EXP): Targetzellen + Effektorzellen
- Effektorzellspontanabgabe (ESR): nur Effektorzellen
- Targetzellspontanabgabe (TSR): nur Targetzellen
- Targetzellmaximumabgabe (TMR): 100 %ige Lysis von Targetzellen (durch Zugabe von Triton X 100)
- Medium (ME): nur Medium
- Volumenkorrektionskontrolle (VCC): nur Medium + Triton X 100



**Tab. 3a:** Beispielhafte Darstellung des Probenverteilungsschemas eines Testansatzes auf einer 96-Kavitäten-Platte.

Targetzellen nicht infiziert						Targetzellen infiziert					
ESR 100:1	ESR 100:1	ESR 100:1	EXP 100:1	EXP 100:1	EXP 100:1	ESR 100:1	ESR 100:1	ESR 100:1	EXP 100:1	EXP 100:1	EXP 100:1
ESR 50:1	ESR 50:1	ESR 50:1	EXP 50:1	EXP 50:1	EXP 50:1	ESR 50:1	ESR 50:1	ESR 50:1	EXP 50:1	EXP 50:1	EXP 50:1
ESR 25:1	ESR 25:1	ESR 25:1	EXP 25:1	EXP 25:1	EXP 25:1	ESR 25:1	ESR 25:1	ESR 25:1	EXP 25:1	EXP 25:1	EXP 25:1
ESR 12,5:1	ESR 12,5:1	ESR 12,5:1	EXP 12,5:1	EXP 12,5:1	EXP 12,5:1	ESR 12,5:1	ESR 12,5:1	ESR 12,5:1	EXP 12,5:1	EXP 12,5:1	EXP 12,5:1
TSR	TSR	TSR	TMR	TMR	TMR	TSR	TSR	TSR	TMR	TMR	TMR
ME	ME	ME	VCC	VCC	VCC	ME	ME	ME	VCC	VCC	VCC

Die Berechnung der prozentualen Zytotoxizität in den experimentellen Kavitäten erfolgte durch folgende Formeln, wobei jede Variable jeweils dem Mittelwert einer Dreifachbestimmung entspricht.

1) Abziehen des Hintergrundes:

$$EXP' = EXP - ME$$

$$ESR' = ESR - ME$$

$$TSR' = TSR - ME$$

$$TMR' = TMR - VCC$$

2.) Einsetzen in die Formel:

$$\text{Zytotoxizität (in \%)} = \frac{(EXP' - ESR' - TSR')}{(TMR' - TSR')} \times 100$$

### **3.2.5 Serologie**

#### **3.2.5.1 ELISA**

Um die humorale Immunantwort zu charakterisieren, wurden Serumproben von allen Versuchstieren der Immunisierungs- und Infektionsversuche in einem Antigen-ELISA (ELISA = enzyme linked immunosorbent assay) auf das Vorhandensein von VHSV-Antikörpern untersucht.

Die Bestimmung von VHSV-Antikörpern in den Forellen-Seren erfolgte durch eine indirekte ELISA-Technik. Das Testprinzip beruht auf der Bindung von Serumantikörpern an mikrotiterplattengebundenes VHSV-Antigen, die wiederum von enzymgekoppelten (Peroxidase; POD) Sekundärantikörpern komplexiert werden. Die quantitative Auswertung erfolgte aufgrund einer colorimetrischen Enzym(POD)-Substrat(OPD)-Reaktion (Engvall, 1977; Engvall & Perlmann, 1972).

##### **3.2.5.1.1 Antigenherstellung (Virusisolierung und -aufreinigung)**

Virushaltiger Zellkulturüberstand aus infizierten RTG-2-Zellkulturen (80 % CPE, Kulturflaschen T162) wurde nach einem Gefriertauschritt durch Zentrifugation (2000 x g, 30 min) von Zellresten befreit. Die geklärte Lösung wurde ultrazentrifugiert (97000 x g, 4 °C, 3 h) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in TNE aufgenommen, auf einen Saccharosegradienten (aufsteigend: 20, 40, 50, 60 %; Dichtegradient) gegeben und erneut ultrazentrifugiert (97000 x g, 10 °C, 3 h). Die Proteinbanden auf den einzelnen Schichten (40, 50, 60 % Saccharose) und das Pellet wurden getrennt abgenommen und jeweils in TNE resuspendiert.

Der Proteingehalt der Virusproteinsuspensionen wurde nach der Lowry-Methode (Lowry et al., 1951) bestimmt. Diese Methode beruht auf zwei Reaktionen: 1. Bildung eines blau-violetten Komplexes von Peptiden mit Kupfer(II)-Ionen in alkalischer Lösung und 2. Bildung eines blauen Komplexes unter Reduktion von Heteropolysäuren (enthalten im Folin-Phenol-Reagenz) durch aromatische Aminosäuren zu Mischoxiden. Auf einer Mikrotiterplatte wurden je 50 µl der zu vermessenden Proben mit 50 µl Lowry-Reagenz versetzt. Nach 15 min folgte die

Zugabe von je 150 µl Folin-Phenol-Reagenz, welches zuvor 1:10 mit Aqua dest. verdünnt worden war. Nach 45 min schloss sich die photometrische Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 540 nm am ELISA-Reader an. Gleichzeitig mit den Proben wurde die Proteinmenge einer Verdünnungsreihe des Standardproteins BSA bestimmt. Die erhaltenen Absorptionswerte wurden durch lineare Regression in Proteinkonzentrationen umgerechnet. Die Proteinfraction oberhalb der 40 %igen Saccharoseschicht (Dichte 1,176 g/ cm<sup>3</sup>) hat die höchste Reinheit.

Die Virusproteinsuspensionen wurden mit Adsorptionspuffer auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt und entweder sofort zur Beschichtung von ELISA-Platten verwendet oder bei -20 °C gelagert.

Zur Kontrolle wurde die VHS-Virusproteinsuspensionen in einer SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen analysiert. Die Proben wurden 1:1 in PAGE-Probenpuffer aufgenommen und 2 min bei 85 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Proteine in diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen (3 %iges Sammelgel, 12 %iges Trenngel) bei 175 V in der Gelapparatur unter Anwesenheit von PAGE-Laufpuffer, bis der Bromphenolblau marker das Gel vollständig durchlief (45-60 min). Das Gel wurde anschließend 30 min in Coomassie-Lösung gefärbt und mindestens 2 h entfärbt (Entfärber-Lösung). Anhand eines Molekulargewichtsstandards (Roti-Mark<sup>®</sup> 10-150 Plus, Roth) konnten auf dem Gel die charakteristischen Banden für die einzelnen VHS-Virusproteine identifiziert werden (nicht dargestellt).

### **3.2.5.1.2 ELISA-Durchführung**

ELISA-Mikrotiterplatten wurden mit VHS-Virusantigenlösung (30 µg Antigen in 10 ml Adsorptionspuffer) beschichtet (100 µl/Kavität). Die Antigenadsorption erfolgte über Nacht im Kühlschrank (4 °C).

Die Platten wurde dreimal mit Waschpuffer gewaschen, auf Zellstoff ausgeklopft und zur Blockierung der freien Bindungsstellen 1 h mit Roti-Blocklösung (1:10 mit Aqua dest. verdünnt) inkubiert (100 µl/Kavität). Nach dreimaligem Waschen und Ausklopfen der Platte wurden die Serumproben mit einer Anfangsverdünnung von 1:50 aufgegeben, auf der Platte 1:1 titriert und 1 h inkubiert. Nach dreimaligem

Waschen und Ausklopfen folgte eine einstündige Inkubation mit einem gegen Forellen-IgM gerichteten Sekundärantikörper der Maus (4C10; Verdünnung 1:200). Es wurde dreimal gewaschen und ausgeklopft und 1 h mit einem POD-konjugierten anti-Maus IgG/IgM Antikörper (Verdünnung 1:10000) inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde die zuvor frisch hergestellte Substratlösung (OPD) dazugegeben (100 µl/Kavität). Nach 10-20 min wurde die Farbreaktion mit 4 N Schwefelsäure (50 µl/Kavität) gestoppt und die Farbtintensität bei 492 nm am ELISA-Reader quantifiziert.

### **3.2.5.2 Plaque-Neutralisationstest (PNT)**

Der Neutralisationstest ist charakterisiert durch die Bindung von Antikörpern an Oberflächen-Antigene von Viruspartikeln, wodurch eine Hemmung des plaqueformenden, zytopathogenen Effekts (CPE) in der Zellkultur erreicht wird.

Die Seren der im VHSV-Infektionsversuch verwendeten Forellen wurden im Labor von Niels Lorenzen, Danish Veterinary Institut, Arhus, Dänemark auf ihre virusneutralisierenden Eigenschaften untersucht.

Es wurde ein Plaque-Neutralisationstest wie von Olesen and Jorgensen (1986) beschrieben angewendet. Dazu wurde eine konstante Verdünnung von VHSV mit verschiedenen Verdünnungen der Fischseren, die zur Inaktivierung der internen Komplementaktivität 30 min bei 45 °C hitzebehandelt wurden, vermischt und für 30 min bei 15 °C inkubiert, bevor Komplement in Form von normalem Forellenserum zugegeben wurde. Nach einem weiteren Inkubationsschritt von 30 min erfolgte die Inokulation der Mixtur auf EPC-Zellen, die zuvor auf 96-Kavitätenplatten ausgesät wurden. Nach einer Inkubationszeit von 4 Tagen bei 15 °C wurden die Zellkulturen in 10 %igem Formalin fixiert und mit Kristallviolett gefärbt. Die Titer der zu bestimmenden Seren wurden aus dem Reziprokwert der Serumverdünnung berechnet, die im Vergleich zu einem normalen Forellenserum zu einer 50 %igen Reduktion der CPE-Plaquezahlen führte.

### 3.2.6 Untersuchung von mRNA-Expression

#### 3.2.6.1 RNA-Extraktion

Zwischen  $10^6$  und  $10^7$  Zellen wurden pelletiert, sofort für die RNA-Extraktion verwendet oder bis auf weiteres bei  $-20\text{ °C}$  gelagert. Die „Gesamt-RNA“ wurde mit dem EZ-RNA Total RNA Isolation Kit nach einem modifizierten Protokoll von Chomczynski and Sacchi (1987) extrahiert. Zur Lysis und Denaturierung von Proteinen wurden 500  $\mu\text{l}$  Lösung A auf die pelletierten Zellen (in 50  $\mu\text{l}$  Medium) gegeben und 5 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Für die spätere Normalisierung der RNA-Extraktions- und RT-PCR-Effizienz (bei der quantitativen RT-PCR, siehe unten) wurde nach diesem Präparationsschritt eine definierte Menge an rekombinanter RNA, kodierend für das enhanced green fluorescent protein (EGFP), zugefügt. Die Menge an zugefügter EGFP-RNA war direkt proportional zu der Menge an Zellen, die für die RNA-Isolation verwendet wurden (auf jeweils  $10^7$  Zellen:  $2 \times 10^6$  Kopien RNA kodierend für EGFP in 10  $\mu\text{l}$ ). Die RNA-Extraktion erfolgte nach Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  Lösung B, 15 s vortexen und 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT). Nach Zentrifugieren des Gemisches (9600 x g, 15 min,  $4\text{ °C}$ ) wurde die obere, farblose Phase auf 500  $\mu\text{l}$  Isopropanol gegeben und bei RT für 10 min inkubiert, um die extrahierte RNA zu präzipitieren. Die RNA wurde anschließend abzentrifugiert (9600 x g, 8 min,  $4\text{ °C}$ ), mit 70 %iger Ethanollösung gewaschen und nochmals abzentrifugiert (4000 x g, 5 min,  $4\text{ °C}$ ). Das Pellet wurde getrocknet und in DEPC behandeltem destillierten Wasser aufgenommen und 15 min bei  $55\text{ °C}$  geschüttelt. Das Volumen destillierten Wassers, welches für die endgültige Verdünnung der isolierten Gesamt-RNA verwendet wurde, war direkt proportional zur eingesetzten Zellzahl. Die RNA aus  $10^7$  behandelten Zellen wurden in 100  $\mu\text{l}$  DEPC-Wasser aufgenommen. Die abgekühlte RNA-Lösung wurde sofort für weitere Untersuchungen verwendet oder bis auf weiteres bei  $-20\text{ °C}$  gelagert.

#### 3.2.6.2 Quantitative RT-PCR

Die quantitative RT-PCR (Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion) ist eine sensitive Methode zur Bestimmung von mRNA-Mengen (messenger RNA). Bei der

quantitativen RT-PCR wird die mRNA zunächst in cDNA (complementary DNA) umgeschrieben und anschließend deren Menge durch quantitative Echtzeit-PCR (auch ‚real-time-PCR‘ genannt) bestimmt. Auf diese Weise erhält man ein aussagekräftiges Bild davon, wie stark ein Gen abgelesen wird (Higuchi, 1992).

Nach der Reversen Transkription erfolgt die DNA-Synthese im Wesentlichen in drei Schritten: Jeder Zyklus besteht aus 1) einem Denaturierungsschritt bei 95 °C, bei dem DNA-Stränge in Einzelstränge aufgetrennt werden, 2) einem Hybridisierungsschritt, in dem die beiden Primer an den jeweils komplementären Strang binden, und 3) einem Syntheseschritt, währenddessen der zwischen den Primern liegende reverse DNA-Abschnitt mithilfe der DNA-Polymerase und der im Reaktionsmix vorhandenen Desoxyribonukleotide synthetisiert wird. Während jedes PCR-Zyklus verdoppelt sich die Menge der spezifischen DNA-Abschnitte und dient im nächsten Zyklus wiederum als Matrize für die Amplifikationsreaktion (Mullis, 1987).

Um die Bildung des Produktes quantitativ verfolgen zu können, bieten sich mehrere Methoden an. So genannte TaqMan-Sonden (Heid, 1996) bieten die Möglichkeit, während der PCR ausschließlich das gewünschte DNA-Produkt nachzuweisen. Das sind kurze DNA-Stücke, die im mittleren Bereich der bereits vorhandenen Template-DNA hybridisieren, bevor es zur Polymerisation des nächsten Doppelstranges kommt. Die Sonden sind am 5'-Ende mit einem Reporterfarbstoff (zum Beispiel HEX oder FAM) und am 3'-Ende mit einem Quencher (zum Beispiel BHQ1 oder TAMRA) gekoppelt, der die Fluoreszenz von Farbstoffen in seiner Nähe abfängt. Die Polymerase ist in der Lage, die Sonde bei der Verdopplung der DNA-Vorlage wieder abzubauen. Dabei wird der Reporterfarbstoff räumlich vom Quencher getrennt, wodurch dessen Fluoreszenz messbar wird. Jedes freigesetzte Molekül Reporterfarbstoff steht daher für einen gebildeten DNA-Strang.

### **3.2.6.2.1 Primer, Sonden**

Die verwendeten Primer und Sonden für die quantitative RT-PCR wurden mit dem Programm Beacon Designer (Version 2; Premier Biosoft International, USA) konstruiert.

Für die EGFP-RT-PCR wurden das Primerpaar EGFP1-F (sense) / EGFP2-R (antisense) und die dazugehörige EGFP-Sonde verwendet (Tabelle 4). Die Sonde war mit HEX (Hexachlorofluorescein) und BHQ 1 (black hole quencher 1) markiert. Für die Amplifikation des CD8 $\alpha$ -Fragments und des NKEF-Fragments wurden Sonden verwendet, welche mit FAM (Carboxy-Fluorescein) und TAMRA (Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin als Quencher) markiert waren (Tabelle 4). Die CD8 $\alpha$ -Primer wurden so entworfen, dass sie auf der korrespondierenden genomischen DNA einen Abschnitt mit einem Intron überspannen. Nach der quantitativen RT-PCR wurde die amplifizierte DNA durch eine Agarose-Gelelektrophorese zusätzlich dahingehend überprüft, dass keine genomische DNA (längeres Produkt) amplifiziert wurde.

**Tabelle 4:** Primer und Sonden, die für die quantitative RT-PCR verwendet wurden.

<b>EGFP</b>		
sense-Primer	EGFP1-F	5'-GACCACTACCAGCAGAACAC-3'
antisense-Primer	EGFP2-R	5'-GAACTCCAGCAGGACCATG-3'
Sonde	EGFP1-HEX	HEX-5'-AGCACCCAGTCCGCCCTGAGCA-3'-BHQ1
Produktlänge	132 bp	
<b>CD8<math>\alpha</math></b>		
sense-Primer	CD8-s	5'-CATCCTGTGAGTTGATTGTTTGGG-3'
antisense-Primer	CD8-as	5'- CCTATAGCCAACAACAGACT-3'
Sonde	CD8-s-probe	FAM-5'-ACTGCTGGCTGTGGCTTCCTCTTCC-3'- TAMRA
Produktlänge	181 bp	
<b>NKEF</b>		
sense-Primer	NKEF-s	5'-AGTAGAGGCAAAGTGAAGATGGC-3'
antisense-Primer	NKEF-as	5'-AGGTGAAGTCCAGCGGGTAG-3'
Sonde	NKEF-s-probe	FAM-5'-AAAGCACGCATCGGGCATCTGGC-3'- TAMRA
Produktlänge	166 bp	

### 3.2.6.2.2 Durchführung, Berechnung

Es wurden zwei separate RT-PCRs (EGFP und CD8 $\alpha$  beziehungsweise NKEF) mit dem One step RT-PCR Kit (Quiagen, Deutschland) durchgeführt. Es wurde für jede Reaktion ein 25  $\mu$ l RT-PCR-Ansatz verwendet (DEPC-Wasser: 10,5  $\mu$ l; RT-PCR-Puffer (fünffach): 5,0  $\mu$ l; dNTP-Mix (10 mM): 1,0  $\mu$ l; Enzymmix: 0,5  $\mu$ l; RNAsin

(RNase-Inhibitor 40 U/ $\mu$ l, Promega): 1,0  $\mu$ l; Sonde: 1,0  $\mu$ l; Primer (sense und antisense): je 2,5  $\mu$ l). Die Bedingungen für die RT-PCRs waren: 60 °C für 30 min, dann 95 °C für 15 min, gefolgt von 42 Zyklen von 15 s 94 °C, 15 s 57 °C und 30 s 62 °C. Die quantitative RT-PCR wurde in dem Gerät Mx3000P durchgeführt und ausgelesen. Die Daten wurden mit der Mx3000P v.200 Software ausgewertet.

Um die erhaltenen Messwerte zu normalisieren, wurden die Ergebnisse der CD8 $\alpha$ -PCR und der NKEF-PCR mit den Ergebnissen der EGFP-PCR verrechnet (Hoffmann, 2005; Dijkstra, 2006). Da den Proben vor der Gesamt-RNA-Extraktion pro Zellzahl gleiche Mengen an EGFP-RNA zugesetzt worden waren, sollten in jedem EGFP-RT-PCR Ansatz äquivalente Mengen an EGFP-DNA amplifiziert werden, was sich in gleichen  $C_t$  (threshold cycle)-Werten ausdrücken würde. Der  $C_t$ -Wert wird definiert als die Zykluszahl, bei der ein statistisch signifikanter Anstieg an Fluoreszenz gemessen werden kann und ist umgekehrt proportional zum Logarithmus der initialen Kopienzahl. Eine Differenz im  $C_t$ -Wert von einem Zyklus entspricht der Hälfte beziehungsweise dem Doppelten an mRNA-Kopien. Da die quantitative RT-PCR unterschiedliche  $C_t$ -Werte für die EGFP-Amplifikation ergab, musste das bei der Beurteilung der CD8 $\alpha$  und NKEF  $C_t$ -Werte berücksichtigt werden. Dementsprechend repräsentieren höhere EGFP- $C_t$ -Werte geringere Gesamt-RNA-Extraktions- beziehungsweise PCR-Effizienzen und umgekehrt. Deshalb wurden innerhalb eines RT-PCR-Ansatzes die einzelnen  $C_t$ -Werte auf einen Referenz- $C_t$ -Wert aus diesem Ansatz normalisiert. Wenn ein EGFP- $C_t$ -Wert höher war als der Referenz- $C_t$ -Wert, musste die Differenz dieser beiden EGFP- $C_t$ -Werte von dem entsprechenden CD8 $\alpha$ - $C_t$ -Wert beziehungsweise NKEF- $C_t$ -Wert abgezogen werden und umgekehrt (Dijkstra, 2006). Der normalisierte CD8 $\alpha$ - $C_t$ -Wert beziehungsweise NKEF- $C_t$ -Wert konnte nun für einen direkten Vergleich der Werte untereinander beziehungsweise mit denen der Kontroll-RNAs (von nicht infizierten beziehungsweise Kontrollplasmid injizierten Fischen) herangezogen werden. Dazu wurden die  $C_t$ -Werte der Kontroll-RNAs auf 100 % festgesetzt.



### 3.2.7 Durchflußzytometrie (FACS-Analyse)

Die Durchflußzytometrie (auch FACS - Fluorescence Activated Cell Sorting) ist eine Methode zur automatisierten Zählung und Analyse fluoreszenzoptischer Eigenschaften sowie dem Streulichtverhalten von Zellen in einem Flüssigkeitsstrom. Die FACS-Analyse dient der quantitativen Bestimmung fluoreszenzmarkierter Oberflächenmoleküle beziehungsweise intrazellulärer Proteine. Grundlage ist meistens eine Antigen-Antikörper-Reaktion mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper. Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung an einem Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Bei Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes verhält sich die emittierte Fluoreszenz proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern pro Zelle. Zusätzlich werden durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgröße und die Granularität der Zellen gewonnen.

Bei den beschriebenen Versuchen wurden PBL von Regenbogenforellen in einem ersten Schritt mit jeweils einem Leukozytenpopulations-spezifischen monoklonalen Antikörper (42-1 für Thrombozyten; 4C10 für B-Zellen; Q4E für Granulozyten/Monozyten) für 20 min inkubiert, zweimal gewaschen und mit einem FITC-markierten Sekundärantikörper (anti-mouse Ig F(ab)<sub>2</sub>') für 20 min inkubiert. Nach erneutem zweimaligen Waschen wurden die Zellen am FACS-Gerät analysiert. Dazu wurde die Software Cellquest (Beckton Dickinson) verwendet.

### 3.2.8 Statistik

Die Auswertung der Untersuchungsergebnisse erfolgte mit den statistischen Funktionen des Microsoft® Excel Graphikprogrammes der Version 97.

Statistische Analysen zur Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den gemessenen Werten basierten auf dem Student's T-Test. Als Irrtumswahrscheinlichkeit wurde  $\alpha = 5\%$  (Vertrauensintervall: \* $p < 0,05$ ) beziehungsweise  $\alpha = 0,1\%$  (\*\* $p < 0,001$ ) angesetzt. Bei der Angabe von Mittelwerten wurde zusätzlich auf die Standardabweichung Bezug genommen (Fehlerbalken).