Bachelorarbeit

Entwicklung und Optimierung einer Rekombinase Polymerase Amplifikation zur Detektion von Influenza A und B Viren

Julius Rublack

Matrikel Nr.: 3801533

17 Januar, 2023

Erstbetreuer: Dr. rer. nat. Gregory Dame
Zweitbetreuer: Dr. rer. nat. Barbara Hansen

Institut für Mikrobiologie und Virologie
Medizinische Hochschule Brandenburg - Theodor Fontane

Inhaltsverzeichnis

1 Abkürzungsverzeichnis **IV**

2 Einleitung **1**

2.1 Viren - Die Gefahr aus dem nichts . . . 1

2.2 Die Influenza Viren - Pandemieverursacher Nr. 1 . . . 1

2.2.1 Influenza A . . . 1

2.2.2 Influenza B . . . 3

2.3 Nachweismethoden von Influenz . . . 3

2.4 Amplifikation . . . 3

2.4.1 RT Polymerase chain reaktion . . . 3

2.4.2 Isotherme Amplifikation . . . 3

2.4.3 Schleifenvermittelte isotherme Amplifikation . . . 3

2.4.4 Nukleinsäure sequenz-basierte Amplifikation . . . 4

2.4.5 RCA rolling circle Amplifikation . . . 6

2.4.6 HDA helicase dependent amplifikation . . . 6

2.4.7 NEAR nicking enzyme amplifikation reaction . . . 6

2.4.8 RPA rekombinase polymerase Amplifikation . . . 6

2.5 Projektziel . . . 6

2.6 Ziel der Arbeit . . . 6

3 Material und Methoden **7**

3.1 Bioinformatische Methoden . . . 7

3.1.1 Rekombinase Polymerase Amplifikation Primerdesign . . . 7

3.1.2 Modifikation der Fluoreszenzsonden . . . 7

3.1.3 Statistische Auswertung der Amplifikationen . . . 8

3.1.4 Vergleich von Anstiegszeiten . . . 10

3.1.5 Probit-Analyse . . . 10

3.2 Herstellen der RNA-Standards . . . 10

3.2.1 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA . . . 10

3.2.2 Extraktion von Plasmid-DNA aus Übernachtkulturen . . . 11

3.2.3 Sequenzierung der isolierten Plasmide . . . 11

3.2.4 Restriktionsverdau und Linearisierung von Plasmiden . . . 12

3.2.5 DNA-Aufreinigung des Restriktionsverdaus . . . 12

3.2.6 *In Vitro* Transktription zur Herstellung von viralen RNA-Standards . . . 13

3.2.7 Ribogreen Assay zur Quantifizierung von RNA . . . 13

3.2.8 Isolation von viraler RNA aus Nasopharyngeal-Abstrichen . . . 13

3.3 Nukleinsäure Amplifikation . . . 13

3.3.1 Real Time Polymerase Kettenreaktion . . . 13

3.3.2 Rekombinase Polymerase Amplifikation . . . 14

4 Ergebnisse **17**

4.1 Entwicklung eines Rekombinase Polymerase Amplifikationssystems für das Influenza A Virus 17

4.1.1 Herstellung der Influenza A Virus Standard-RNA . . . 17

4.1.2 Entwicklung von spezifischen Primern und Sonden für das Influenza A Virus 19
4.2 Entwicklung eines Rekombinase Polymerase Amplifikationssystems für das Influenza B Virus 19
4.2.1 Rekombinase Polymerase Amplifikation-Primerdesing für das Influenza B Virus 19
4.2.2 Herstellung der Influenza B Virus Standard-RNA 19
4.2.3 Ermittlung der Sensitivität der Influenza B PCR 20
4.2.4 Etablierung der Influenza B Rekombinase Polymerase Apmlifikations-Assays 21
4.2.5 Optimierung der Influenza B Rekombinase Polymerase Amplifikation 22
4.2.6 Ermittlung der Sensitivität der Influenza B Rekombinase Polymerase Amplifikation . 23
4.2.7 Ermittlung der Spezifität der Influenza B Rekombinase Polymerase Amplifikation . . 24
4.3 Entwicklung eines Rekombinase Polymerase Amplifikationssystems für das Influenza A Virus 26
4.3.1 Rekombinase Polymerase Amplifikation-Primerdesing für das Influenza B Virus 26

5 Anhang **I**

Literaturverzeichniss **VIII**

Abbildungsverzeichnis

1 Schematischer Aufbau eines Influenza A Virus . . . 2
2 Primer-Bindungsstellen und Hantelstruktur der LAMP . . . 4
3 Schematischer Reaktionsmechanismus der NASBA . . . 5
4 Kontrollgel des Restriktionsverdaus und Ribogreen Kalibrationsgeraden der Influenza A Plasmide. . . . 18
5 Kontrollgel und Ribogreen Kalibrationsgerade der Influenza B Standardherstellung . . . 20
6 Sensitivitätsanalyse der Influenza B PCR . . . 21
7 Etablierung der Influenza B RPA im Original- und 8tel-Ansatz. . . . 22
8 Einfluss der Temperatur und der Primerkonzentration auf die Influenza B RPA . . . 23
9 Sensitivitätsanalyse der Influenza B RPA . . . 25
10 Etablierung der Influenza B RPA im Original- und 8tel-Ansatz. . . . I
11 Plasmidkarte des Influenza B Plasmides . . . III
12 Plasmidkarte des Influenza A Plasmides für den Influenza H3N2 (2005) RNA-Standard . . . IV
13 Plasmidkarte des Influenza A Plasmides für den Influenza H1N1 (2004) RNA-Standard . . . V
14 Plasmidkarte des Influenza A Plasmides für den Influenza H3N2 (2020) RNA-Standard . . . VI
15 Plasmidkarte des Influenza A Plasmides für den Influenza H1N1 (2020) RNA-Standard . . . VII

Tabellenverzeichnis

1 Parameter für das Primerdesign mit dem PrimedRPA Programm . . . 7
2 Temperaturprotokoll für die Kolonie-PCR . . . 11
3 Zusammensetzung des Influenza PCR-Reaktionsmixes . . . 14
4 Zusammensetzung des Influenza A Primer-Sonden-Mixes . . . 14
5 Zusammensetzung des Influenza B Primer-Sonden-Mixes . . . 14
6 Temperaturprotokoll für die Influenza PCR . . . 15
7 Entwickelte Primer und Sonden für die Recombinase Polymerase Amplifikation . . . 15
8 Zusammenstzung des Rehydrationsmixes . . . 15
9 Zusammenstzung des Rehydrationsmixes für den 8-tel Ansatz . . . 16
10 Zusammenstzung des Primer-Sonden-Mixes für den 8-tel Ansatz . . . 16
11 Quantifizierung der Influenza A RNA-Standards . . . 19
12 Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 7 . . . I
13 Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 8A . . . II
14 Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 8B . . . II
15 Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 10C . . . II

1 Abkürzungsverzeichnis

2 Einleitung

2.1 Viren - Die Gefahr aus dem nichts

Infektionskrankheiten verursacht durch Viren oder multiresistente Bakterien sind eine ernstzunehmende Bedrohung für Menschen und Staaten. Dabei sorgen virale Epidemien und Pandemien wie die Spanische Grippe (1918) mit über 50 Millionen Toten (Dharmapalan 2020), das Chikungunya virus (2006) mit mehr als 1,3 Millionen Infizierten (Charrel, Lamballerie, and Raoult 2007), und die aktuelle SARS-CoV-2 Pandemie mit weit über 140 Millionen Infizierten (Bai, Zhong, and Gao 2021) für weltweite Kriesen und Milliardenschäden (Louie et al. 2009).
Viren lassen sich als ca. 16 nm bis 200 nm große infektiöse Einheiten, bestehtend aus einer Proteinhülle mit einem DNA oder RNA Kern beschreiben. Sie haben keinen eigenen Reproduktionsmechanismus und sind auf die Infizierung von anderen Zellen angewiesen, welche mithilfe ihrer Reproduktions-Maschienerie die Viralen Komponenten vervielfältigen (Modrow et al. 2010). Viren zeigen eine hohe Mutationsrate wodurch neue Varianten enstehen und Immunlücken gefunden werden (Sanjuán and Domingo-Calap 2016). Dadurch entstehen neue Infektionsherde und neue Pandemien (**quelle?**) Gerade die vorherrschende SARS-Cov-2 Pandemie hat gezeigt, dass eine frühzeitige, schnelle und effiziente Detektion von viralen Krankheiten notwendig ist, um die Gesundheitssysteme zu entlasten und die Infektionsketten zu unterbrechen (Valera et al. 2021). Goldstandard PCR —> point of care —> Isothermale Amplifikation.

2.2 Die Influenza Viren - Pandemieverursacher Nr. 1

erwähnen, dass influenza Grippe ist

2.2.1 Influenza A

Das zur Virusfamilie der Orthomyxoviren gehörige Influenza A Virus ist ein behülltes, einzelsträngiges RNA Virus. Die genomische RNA, welche in negativer Strang-Orientierung, also entgegen der 5´-3´ Leserichtung der Ribosomen vorliegt, ist in 8 unterschiedlich große Abschnitte unterteilt (siehe Abbildung 1). Das ca. 13.500 bp große, segmentierte Genom codiert dabei für mindestens 17 Proteine, wobei die 3´ und 5´ Regionen keine codogenen Bereiche enthalten, sondern komplementär zueinander sind. Dadurch bilden sie über eine kurze Distanz einen Doppelstrang aus, welcher als Signalsequenz bei Transkription dient (Modrow et al. 2010; Chen et al. 2018). Von den 17 codierten Proteinen zählen 10 als Essentiell Wichtig, während der Rest als Accessoire-Proteine zählt (Vasin et al. 2014). Zu den essentiellen Proteinen zählen die Neuraminidase (NA), welche im Verlauf der Infektion für die Freisetzung der Viruspartikel verantwortlich ist, das Hämagglutinin (HA), welches bei der Infektion der Zelle eine Rolle spielt, das Matrixproteinen (M1), das Membranprotein (M2), die Nichtstrukturproteine NS1 und NS2, das nukleoprotein (NP), sowie die 3 Untereinheiten PA, Pb1 und Pb2 der RNA-Polymerase (Luo 2011; Krammer et al. 2018). Die Accessoire-Proteinen sind auf alternativen offene Leserahmen (engl.: *open reading frame*, ORF) codiert. Diese erlauben es Viren eine größere Protein-Vielfalt auf engen genomischen Raum, durch die "mehrfachverwendung" einer Nukleotid-Sequenz, zu expremieren. Diese alternativen ORF enstehen dabei durch verschiedene molekularbiologische Mechnanismen, wie *frame shifting* bei welchem das Ribosom bei der translation eine Base überspringt und somit den Leseramen ändert, *readthrough* bei dem das Ribosom ein Stopp-codon überspring, oder *internal Ribosom Entry* wobei das Ribosom an ein interes Start-Codon druch eine sogenannte IRES (engl.: *internal ribosomal entry site*) rekrutiert wird, sowie einige weitere (Firth and Brierley 2012). Zu den Accessoire-

Proteinen zählen unter anderem das 2012 entdeckte nichtstruktur Protein 3 (Selman et al. 2012), das von M2 abstammende M42 (Wise et al. 2012) und die dem PA zugehörigen Proteine PA-X, PA-N155 und PA-N182 (Jagger et al. 2012; Muramoto et al. 2013).

Abbildung 1: **Schematischer Aufbau eines Influenza A Virus**: Schematische Darstellung eines Influenza A Virus mit den Längen der einlenen Genom-Segmente in Basenpaaren (bp). Modifizierte nach Modrow et al. (2010).

Die RNA-abhäninge RNA Polymerase des Influenza A Virus besteht wie in Abbildung 1 gezeigt aus den 3 Unterheinheiten PA, PB1 und PB2, wobei die Gensequenz für PA auf dem Segment 3, für PB1 auf dem Segment 2 und PB2 auf dem Segment 1 codiert sind (Krammer et al. 2018). Das heterotrimer assoziert innerhalb des Virus mit den komplementären Sequenzen an den jeweiligen Enden der einzelnen Genom-Segmente. Der restliche Teil der einzelträngigen RNA wird von oligomeren NP gebunden, welches auf dem Segment 5 codiert ist. Dieser RNA-Protein-Komplex ist in der Literatur als vRNP-Komplex (engl.: *viral ribonucleoprotein*) beschrieben (Krammer et al. 2018; Velthuis and Fodor 2016). Kryoelektronenmikroskopische Untersuchungen des vRNP-Komplex zeigten eine doppel-helikae Struktur mit einer SChleife am nicht RNA-Polymerase assoziiertenEnde. Die Helix-Struktur wird dabei durch eine Assozitation von unterschiedlich polaren oligo-NP-Proteinen stabilisiert (Arranz et al. 2012). Das Virion des Influenza A Virus besteht wie in Abbildung aus einer äußeren choletesterol haltigen doppel-Lipid Schicht, in welche die glycoproteine NA, HA und M2 integriert sind (To and Torres 2019; Modrow et al. 2010). Hier schon erwähnen, dass die Membran vom wirt und nicht vom Virus stammt? Oder das doch lieber beim Infektionsmechanismus Die darunter liegende Proteinmatrix besteht aus oligomeren M1-Proteinen, welche auf dem Genom-Segment 7 codiert sind. Dieses Matrixprotein dient als Angelpunkt und bindet alle anderen Struktur-bildenden Komponenten wie den vRNP-Komplex, die Membranbindenden Glycoproteine, sowie die Lipidmembran durch seine positive Polarität (Kordyukova et al. 2018; Chlanda and Zimmerberg 2016). Das M1-Protein erfüllt dadurch eine essentielle Rolle bei dem Zusammenbau des Virus und der nachfolgenden Umhüllung mit Wirts-Lipiden, dem sogena-

annten *Budding* (Nayak et al. 2009). Durch seine komplexe Funktion und die verschieden Bindungsdomänen für die anderen Strukturkomponenten, ist die Aminosäuresequenz des M1-Protein am stärksten im viralen Genom konserviert (McCauley and Mahy 1983; Kordyukova et al. 2018).

2.2.2 Influenza B

2.3 Nachweismethoden von Influenz

2.4 Amplifikation

2.4.1 RT Polymerase chain reaktion

2.4.2 Isotherme Amplifikation

2.4.3 Schleifenvermittelte isotherme Amplifikation

Die erstmal im Jahr 2000 von Notomi (2000) entwickelte Schleifenvermittelte isotherme Amplifikation (engl.: *loop mediated isothermal amplifikation*, LAMP) ist eine effektive isotherme Amplifikationsmethode von DNA bei einer Konstanten Temperatur von 60 - 65 °C. Im Gegensatz zur der PCR werden bei der LAMP 4 bis 6 Primer verwendet, um die Nukleinsäure zu amplifizieren. Dadurch erreicht die LAMP einerseits sehr hohe Spezifitäten, da die 4 essenziellen Primer binden müssen, andererseits aber hohe Anforderung an die Optimierung und das Primer-Design (Soroka, Wasowicz, and Rymaszewska 2021). Die Primer werden dabei in innere Primer, äußere Primer und sogenannte Loop Primer unterteilt. (Nagamine, Hase, and Notomi 2002). Die äußeren Primer, bestehend aus forward und reverse Primer sind zweigeteilt, wobei der 3´-Teil jedes Primers komplementär zum jeweiligen Strang (forward- / reverse-Strang) ist. Der zweite Teil der Primer hingegen ist komplementär zu einer Stelle auf dem gegenüberliegenden DNA-Strang. Diese Zweiteilung der Primer sorgt im späteren Verlauf der Reaktion für die Bildung einer Hantel ähnlichen Struktur. Die äußeren Primer, ebenfalls bestehend aus forward und reverse Primer binden weiter außen auf dem DNA-Doppelstrang und liegen in niedrigerer Konzentration vor als die inneren Primer. Zusätzlich können optional die Loop Primer verwendet werden, welche in den Köpfen der gebildeten Hantelstruktur binden (Huang et al. 2020). Ebenfalls nötig für die Amplifikation ist eine DNA-Polymerase, welche eine hohe DNA-Strang Verdrängungs-Aktivität besitzt (Park 2022).
Der Reaktionsmechanismus der LAMP kann in zwei Phasen unterteilt werden; der nicht zyklischen Phase und der zyklischen Phase. Im ersten Schritt der nicht zyklische Phase hybridisiert einer der inneren Primer mit seinem 3´-Ende an die zu amplifizierende DNA. Dadurch kann eine Strangverlängerung des Primers durch die Polymerase stattfinden und mithilfe der Strang Verdrängungs-Aktivität wird der ursprüngliche Doppelstrang abgelöst. Anschließend bindet der äußere Primer hinter dem neu entstandenen Doppelstrang, es findet abermals eine Strangverlängerung statt und der innere Primer mit der neu synthetisierten DNA wird verdrängt. Der nun entstandene DNA-Einzelstrang besitzt an einem Ende die Sequenz des inneren Primers, und bildet durch den hinteren komplementären Teil des Primers eine Schleife aus. Der beschriebene Amplifikations-Schritt wird mit den entgegen gesetzten inneren und äußeren Primern wiederholt, sodass eine einzelsträngige DNA entsteht, welche an beiden Enden die Sequenzen der inneren Primer besitzt. Dadurch nimmt diese einzelsträngige DNA, die oben erwähnte Form einer Hantel an und der nicht zyklische Teil der Amplifikation ist damit beendet (Parida et al. 2008).

Die gebildete Hantelstruktur dient in der zweiten Phase der Amplifikation als Startpunkt. Hier können nun die verschiedenen Primer gleichzeitig binden und somit die Ziel-DNA exponentiell vervielfältigen. Ebenfalls

Abbildung 2: **Primer-Bindungsstellen und Hantelstruktur der LAMP**: **A**: Primerdesign und -bindungsstellen der LAMP. Die inneren Primer besitzen zwei Bindungsstellen auf den unterschiedlichen Strängen der DNA. Die Äußeren Primer liegen "hinter" den inneren und sorgen im Verlauf der Strangverlängerung für eine Verdrängung des DNA-Strangs. **B**: Hantelstruktur als Ausgangspunkt der zyklischen Phase. Die verschiedenen Bindestellen dienen als Startpunkte einer Amplifikation, wodurch eine exponentielle Amplifikation erreicht wird. Modifiziert nach Soroka, Wasowicz, and Rymaszewska (2021)

dient das 3'-Ende der Hantelstruktur als Primer und somit als Startpunkt für die Polymerase. Im Verlauf der Reaktion entstehen verschiedenste Strukturen wie Konkatemere und blumenkohlähnliche Strukturen mit vielen Schleifen (Soroka, Wasowicz, and Rymaszewska 2021; Silva, Pardee, and Pena 2019). Ebenfalls kann durch das zusätzliche Einbringen der Loop Primer, die Anzahl der Startpunkte abermals erhöht werden, was zu einer erhöhten Reaktionsgeschwindigkeit führt (Nagamine, Hase, and Notomi 2002). Eine Amplifikation von RNA ist ebenfalls unproblematisch möglich, jedoch muss eine Reverse Transkriptase Reaktion vor der LAMP vorgeschaltet werden (Chander et al. 2014).
Zur Detektion der Amplifikation können kolorimetrische Fluoreszenzfarbstoffe wie Calcein, welche vor der Messung zugegeben werden (Tomita et al. 2008) oder Fluoreszenzfarbstoffen wie SYBR Green I, welche nach Abschluss der Amplifikation zugegeben werden (Iwamoto, Sonobe, and Hayashi 2003) verwendet werden. Durch die eine hohe DNA-Endkonzentration von 10-20 µg am Ende der Reaktion kann eine Auswertung mit dem bloßen Auge erfolgen (Parida et al. 2008). Ebenfalls kann die Messung der Trübung für den Nachweis einer Positiven Reaktion verwendet werden. Durch die extrem hohe Menge an synthetisierter DNA entstehen große Mengen an Pyrophosphat, welches Magnesium-Ionen bindet und bei hohen Konzentrationen ausfällt. Diese Fällung führt zu einer Trübung der Reaktionsmixtur, welches wiederum quantifiziert werden kann (Mori et al. 2001).

2.4.4 Nukleinsäure sequenz-basierte Amplifikation

Die Nucleinsäure sequenz-basierte Amplifikation (engl.: *nucleic acid sequence-based amplification*, NASBA), auch bekannt unter *self-sustained sequence replication* (3SR) ist eine auf der Transkription basierende, isotherme Amplifikationsmethode zum Nachweis von Nukleinsäuren (Deiman, Aarle, and Sillekens 2002). Die erstmals von Guatelli et al. (1990) erwähnte Methode beruht dabei auf einem Enzym-mix bestehend aus einer reversen Transkriptase (RT), des avian myeloblastosis virus, der RNAse H und einer T7 DNA abhängi-

gen RNA-Polymerase (DdRp) (Deiman, Aarle, and Sillekens 2002). Eine Besonderheit der NASBA liegt im ersten Schritt der Methode. Hier bindet ein ca. 45 bp langer Primer 1 an das 3´-Ende einer einzelsträngigen RNA. Dadurch eignet sich die NASBA besonders zum Nachweis von RNA-Molekülen, da diese direkt zum Start der Reaktion benötigt werden. Durch diese Eigenschaft unterscheidet sich die NSABA zu anderen Amplifikationsmethoden, wo ein RT-Schritt vorgeschalten werden muss (Compton 1991; Bachman 2013; Zhang et al. 2021). Dabei hybridisieren nur 20 bp am 3´-Ende des Primers, da sie komplementär zur Ziel-RNA sind. Das 5-Ende hingegen besitzt eine Promotor-Erkennungssequenz für die DdRp. Nachdem der Primer gebunden hat, wird eine cDNA bei einer Temperatur von 41 °C von der im Reaktionsmix enthaltenen RT synthetisiert. Das entstandene cDNA/RNA-Hybrid wird anschließend von der RNAse H verdaut, sodass der einzelsträngige DNA-Anteil mit der Promotorsequenz im Reaktionsmix enthalten ist. Ein zweiter 20 bp langer Primer2, welcher komplementär zur DNA ist, hybridisiert und die RT vervollständigt den DNA-Doppelstrang. Die nun aktive, doppelsträngige T7-Promotorsequenz, rekrutiert die DdRp, welche um die 100 RNA-Kopien pro DNA-Template erzeugt. Die neu entstandenen RNA-Moleküle gehen in den ersten Zyklus der NASBA ein, indem der Primer2 hybridisiert, die RT ein cDNA/RNA hybrid erzeugt und der RNA-Anteil durch die RNAse H hydrolysiert wird. An diese cDNA bindet wiederum Primer1 und die RT vervollständigt den DNA-Doppelstrang, sodass der Promotor wieder aktiv wird und neue RNA-Kopien erstellt werden können (Compton 1991).

Abbildung 3: **Schematischer Reaktionsmechanismus der NASBA**: Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus der NASBA mit der Initialen Phase und der zyklischen Phase. Die Anfängliche RNA wird durch die Hybridisation von Primern in ein DNA/RNA hybrid überführt, dieses über einen RNAse verdau und erneute DNA synthese in einen DNA-Doppelstrang umgewandelt. Durch den auf dem doppelstrang aktiven Promotor werden viele RNA-Kopien erzeugt, welche in den Amplifikationszyklus eingehen.

Die Amplifikation von DNA-Molekülen als Ausgangsmaterial mittels NASBA ist ebenfalls möglich, jedoch mit einem erhöhten Aufwand und zusätzlichen Denaturierung-Schritten (Malek, Sooknanan, and Compton 1994). Hierbei hybridisiert nach einem initialen Denaturierungsschritt bei 95 °C Primer1 mit der Ziel-DNA und wird durch die frisch dazugegebene RT verlängert. Da kein cDNA/RNA hybrid entstanden ist, kann

die RNAse nicht den Gegenstrang hydrolysieren und ein weiterer Denaturierungsschritt ist nötig. Durch die hohen Temperaturen wird jedoch die RT inaktiviert, wodurch sie mit den anderen Enzymen neu zugegeben werden muss. Anschließend bindet Primer2, der Doppelstrang wird vervollständigt und die DdRp kann über den aktiven Promotor RNA-Kopien erstellen (Deiman, Aarle, and Sillekens 2002).
Zur Detektion und Quantifizierung der amplifizierten RNA können spezielle hybridisations-Sonden sogenannte "Molecular-Beacon" verwendet werden (Deiman, Aarle, and Sillekens 2002). Diese Besitzen die Struktur einer Stem-Loop, wobei das eine Ende mit einem Reporterfluorophor und das andere Ende mit einem Quencher gekoppelt sind. Die Stem-Loop ist dabei so ausgebildet, dass die beiden Enden der Sonde komplementär zueinander Sind und somit Reporterfluorophor und Quencher in direkter Nähe zueinander sind. Die Sequenz innerhalb der ausgebildeten Schleife ist komplementär zu einer Region auf dem zu detektierenden RNA-Molekül. Bei der Bindung der Sonde an die Zielregion öffnet sich die SChleife, Reporterfluorophor und Quencher werden voneinander getrennt und ein Fluoreszenzsignal kann detektiert werden (Omran et al. 2022).

2.4.5 RCA rolling circle Amplifikation

evtl.

2.4.6 HDA helicase dependent amplifikation

2.4.7 NEAR nicking enzyme amplifikation reaction

2.4.8 RPA rekombinase polymerase Amplifikation

2.5 Projektziel

2.6 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit ist es, jeweils ein RPA-System für die Point of care Diagnostik zum Nachweis der Influenza A und B Viren zu entwickeln und zu Optimieren. Dabei soll das Influenza B System alle human pathogenen Viren detektieren können und das Influenza A System die relevanten Subtypen H3N2 und H1N1 nachweisen können. Die Entwicklung der Systeme unterteilt sich dabei in folgende Punkte:

- Erstellung eines definierten RNA-Standards für die einzelnen Viren
- Design und Überprüfung von spezifischen Primer-Sonden-Sets
- Sensitivitäts und Spezifitäts-Testungen

Innerhalb der Optimierung soll das Optimum folgender Reaktionsparameter ermittelt werden:

- Reaktionstemperatur
- Mischzeitpunkt der Reaktion
- Primerkonzentration
- Ansatzvolumen der Reaktion (50 µl RPA und 8tel RPA)

Des Weiteren soll die Wirksamkeit der Entwickelten und Optimierten RPA-Systeme an Patientenproben getestet und die Sensitivität mit PCR-Systemen für die Detektion der gleichen Viren verglichen werden.

3 Material und Methoden

3.1 Bioinformatische Methoden

3.1.1 Rekombinase Polymerase Amplifikation Primerdesign

Für die Erstellung der Primer und Sonden zur Detektion des Influenza A und B Virus wurde das von Higgins et al. (2018) entwickelte Programm *PrimedRPA* verwendet. Die Parameter dafür sind in Tabelle 1 angegeben.

Tabelle 1: Parameter für das Primerdesign mit dem PrimedRPA Programm

Parameter	Wert
Länge der Primer	30 - 34 bp
Länge der Sonde	50 bp
Sondentyp	Exonuclease Sonde
Nukleotid-Wiederholungs-Grenzwert	5 bp
GC-Gehalt für Primer und Sonde	40 - 60 %
Hintergrund-Kreuzreaktivitäts-Grenzwert	65 %
Prozentuale Primer-Sonden Dimersierungstoleranz	40 %

Als Referenzsequenzen für das Influenza A Virus diente jeweils eine Sequenz des Virusgenomsegmentes 7 von den Subtypen H1N1 (GenBank Nr.: MT341937) und H3N2 (GenBank Nr.: MT244214). Die Primer und Sonden wurden so gewählt, dass mindestens 90 % der Primer- und Sondensequenz keine Basenfehlpaarungen zwischen den beiden Subtypen aufweisen. Für das Influenza B Virus diente das Virusgenomsegment 8 (GenBank Nr.: MT637911) als Referenzsequenz. Alle entstandenen Primer/Sonden Sets wurden mit dem Online-Programm *PrimerDimer*[1] von Johnston et al. (2019) auf Eigenhybridisierung und Dimerbildung untersucht. Im Anschluss wurden die Primer-Sonden-Sets mit DNA-Sequenzen des gleichen Virusgenomsegmentes von älteren Stämmen verglichen und mögliche Fehlpaarungen durch die Einführung von degenerierten Primern zu vermeiden. Für das Alignment wurde das Online-Programm *Clustal Omega*[2] beschrieben durch Sievers and Higgins (2017), verwendet. Für die Influenza A Primer-Sonden-Sets wurden zusätzlich degenerierte Basen eingeführt, um eine optimales Alignment an die Sequenzen der beiden Subtypen zu gewährleisten.

3.1.2 Modifikation der Fluoreszenzsonden

Das Prinzip der Fluoreszenzsonden ist bei PCR und RPA gleich. Dieses besteht aus einem fluoreszierenden Reportermolekül und einem sogenannten Quencher, welche sich innerhalb der Sonde in räumlicher Nähe befinden. Der Quencher ist ein weiteres Fluorophor, welches von der Emission des Reportermoleküls angeregt wird und dadurch verhindert, dass die Fluoreszenz des Reportermoleküls detektiert werden kann. Erst wenn die beiden Fluorophore durch Hydrolyse getrennt werden, kann der Quencher nicht mehr das Signal des Reportermoleküls blockieren und die Fluoreszenz kann detektiert werden (S. Bustin 2000). Alle verwendeten PCR-Sonden wurden am 5´-Ende mit einem entsprechendem Reporterfluorophor markiert. Am 3´-Ende sowie an der 9 Basenposition wurden die Sonde mit entsprechende Quenchern markiert. Das Design der RPA-Sonden wurde wie in Behrmann et al. (2020) beschrieben durchgeführt. Dazu wurde die erste Thymin-Base nach ca. 30 bp mit dem Reporterfluorophor markiert, gefolgt von einer a-basischen Seite. Diese besteht aus einem Zuckerphosphat-Rückgrat ohne Nucleobase. Nachfolgend wurde an das nächste Sondenukleotid

[1] http://www.primer-dimer.com/
[2] https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/

ein entsprechender Quencher an gekoppelt. Am 3´-Ende wurde die Sonde mit einem dreikettigen Kohlenstoff-Rest versehen, um eine Kettenverlängerung der Sonde zu unterbinden.

Spacer C3

3.1.3 Statistische Auswertung der Amplifikationen

Für die Entwicklung und Optimierung von Amplifikationsverfahren ist eine einheitliche statistische Auswertung notwendig (Rödiger, Burdukiewicz, and Schierack 2015). Als Werkzeug für die Auswertung wurde die "Open Source" Programmiersprache R verwendet, welches für spezifische Anwendungen beliebig erweiterbar ist durch die Verwendung sogenannter "Packages" (Pabinger et al. 2014).

Normalisierung der Fluoreszenz-Daten:

Für die Normalisierung der Daten wurde, wie in der Literatur beschrieben, der Mittelwert der ersten 5 Messwerte jeder Amplifikationskurve berechnet (Ritz and Spiess 2008). Die berechneten Mittelwerte wurden von den jeweiligen Datensätzen subtrahiert.

Ermittlung signifikanter Amplifikationen:

Die Überprüfung, ob es sich bei einem gemessenen Fluoreszenz-Datensatz um eine positive Amplifikation handelt, wurde mit dem *chipPCR* Paket von Rödiger, Burdukiewicz, and Schierack (2015) durchgeführt. Für die Auswertung wurden folgende Tests durchgeführt.

Shapiro-Wilk Test: Negative Amplifikationen unterliegen einem gleichmäßigen starken Rauschen, weswegen eine Normalverteilung der Daten gegeben ist. Bei positiven Amplifikationen hingegen sind die Daten durch den linearen Anstieg in der exponentiellen Phase der Amplifikation nicht mehr normalverteilt. Anhand dieser Gesetzmäßigkeit lassen sich durch einen Test auf Normalverteilung positive von negativen Amplifikationen unterscheiden (Rödiger et al. 2022). Mithilfe des Shapiro-Wilk Tests (beschrieben durch SHAPIRO and WILK (1965)) für Normalität wird der Datensatz auf Normalverteilung getestet. Bei errechneten P-Werten von $\geq 5 * 10^{-4}$ liegt keine Normalverteilung mehr vor und der Datensatz wurde als positive Amplifikation gewertet.

Residuen Wachstums Test: Bei diesem Test wird die Stabilität der Residuen in der linearen Phase des Anstiegs untersucht. Bei negativen Amplifikationen weichen die Fluoreszenzwerte von dem linearen Modell ab. Dadurch korrelieren die Residuen im Gegensatz zu positiven Amplifikationen stark mit den Fluoreszenzwerten. Anhand eines Schwellenwertes von 0,5 wurde diese Korrelation untersucht und der Datensatz als positive/negative Amplifikation eingestuft.

Vergleichs Test: Innerhalb dieses Tests wird untersucht, ob die ersten 20 % des Datensatzes sich signifikant von den letzten 15 % unterscheiden. Dazu wurden die beiden Datengruppen mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, beschrieben durch Mann and Whitney (1947), verglichen. Besteht ein signifikanter Unterschied, handelt es sich um eine positive Amplifikation.

Signal Level Test: Dieser Test vergleicht zwei aus dem Datensatz berechnete Werte. Ersterer berechnet sich aus Formel (1), wobei MAD[3] (engl. *Mean-absolut deviation*) für die absolute Standardabweichung steht (siehe R-Dokumentation). Der zweite Wert ist das Signal-Rausch-Verhältnis (SNR, engl. *signal noise ratio*), berechnet mit Formel (2). Bei einem um 25 % erhöhtem Wert des SNR im Vergleich zum ersten Wert wird die Amplifikation als positiv gewertet.

[3] https://search.r-project.org/CRAN/refmans/ie2misc/html/madstat.html

$$Median + 2 * MAD \qquad mit \quad MAD = n^{-1} \sum_{i=1}^{n} \left| O_i - \overline{O} \right| \tag{1}$$

$$SNR = \frac{Mittelwert\ der\ Fluoreszenswerte}{Standardabweichung\ der\ Fluoreszenswerte} \tag{2}$$

Polygon Test: Innerhalb dieses Tests wird der Anstieg pro Zeitintervall mit Formel (3) aufsummiert. Bei positiven Amplifikationen erreicht die Summe höhere Werte als bei negativen Amplifikationen, da hier das stärkere Rauschen der Daten die Endsumme niedrig hält. Als Schwellenwert für eine positive Amplifikation wurde hier empirisch ein Wert von 10 festgelegt. (Rödiger, Burdukiewicz, and Schierack 2015).

$$((x_2 - x_1)) * ((y_2 + y_1)) \ \widehat{=}\ (\Delta t) * ((y_2 + y_1)) \tag{3}$$

Des Weiteren ist es üblich, bei Echtzeit-Amplifikationsmethoden einen Schwellenwert einzuführen. Sollte dieser während der Messung nicht überschritten werden, wird die Amplifikation als negativ eingestuft (Aranha et al. 2021). Um dies zu berücksichtigen wurde ein weiterer Test, der *Schwellenwert Test*, eingeführt. Für die Berechnung des Schwellenwertes wurde die von Frey, Canzio, and Zurakowski (1998) beschriebene Methode verwendet. Diese beruht auf dem Median der gesamten Daten, zu welchem ein Faktor addiert wird. Der Faktor bildet sich dabei aus der Standardabweichung (SD) der Daten multipliziert mit einem Term bestehend aus der Probenanzahl (n_1) und den Werten einer einseitigen Student's t-Verteilung (siehe Formel (4)). Für die Schwellenwertberechnung wurden mindestens 6 Negativkontrollen als Datensatz verwendet. Das Konfidenzintervall für die t-Verteilung wurde als 0,99 (99 %) festgelegt.

$$Schwellenwert = \overline{X} + SD * t\sqrt{1 + \frac{1}{n_1}} \qquad mit \quad SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \overline{X})^2}{n_2 - 1}} \tag{4}$$

Um eine Amplifikation als positiv einzustufen, mussten alle aufgeführten Tests ein positives Testergebnis aufweisen. Sobald ein oder mehrere Tests ein negatives Testergebnis zeigten, wurde die Amplifikation als negativ eingestuft.

Ermittlung der Anstiegszeit

Die Anstiegszeit, in der Literatur bei PCR-System nach den MIQE Richtlinien auch als C_q-Wert (engl. *cycle quantification*) angegeben, ist der Zeitpunkt bei, die dem Fluoreszenzwerte einer Amplifikation einen vorher festgelegten Schwellenwert überschreiten und sich zusätzlich signifikant von dem Grundrauschen unterscheiden (S. A. Bustin et al. 2009). Dies lässt sich auch auf die RPA als TT-Wert (engl. *threshold time*) übertragen (Diagne et al. 2020). Für die Ermittlung der Anstiegszeit wurde der im *chipPCR*-Paket vorhandene Befehl "th.cyc" verwendet. Dieser gleicht die Amplifikationskurve im Bereich des vorher festgelegten Schwellenwertes mit einer Polynomfunktion zweiten Grades an und gibt den Schnittpunkt mit dem Schwellenwert als Anstiegszeit aus. Als Schwellenwert wurde der im Schwellenwert Test beschrieben Wert (siehe Kapitel 3.1.3) verwendet (Rödiger, Burdukiewicz, and Schierack 2015).

3.1.4 Vergleich von Anstiegszeiten

Um zu überprüfen, ob eine Veränderung der Reaktionsparameter eine signifikante Veränderung der Anstiegszeiten zur Folge hat, wurden die Mittelwerte der Anstiegszeiten bei 2 Gruppen mithilfe eines T-Tests und bei 3 oder mehr Gruppen mithilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse verglichen. Im ersten Schritt wurden die Daten mit dem Shaprio-Wilk-Test auf Normalität überprüft und anschließend auf Ausreißer untersucht. Datenpunkte, welche über $Q3 + 3 * IQR$ oder unter $Q1 - 3 * IQR$ liegen, wurden als Ausreißer festgelegt und für die folgenden Tests ignoriert. Dabei sind Q1 und Q3 das erste und dritte Quartil der Daten und IQR steht für den Interquartils-Abstand. Nachfolgend wurden die bereinigten Daten auf Varianzhomogenität mit dem Levene-Test überprüft. Bei einem Vergleich von 2 Gruppen wurde bei festgestellter Varianzhomogenität der Student's T-Test und bei signifikant unterschiedlichen Varianzen der Welch T-Test durchgeführt. Bei einem Vergleich von 3 oder mehr Gruppen wurde bei Varianzhomogenität eine einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt, welche bei einem p-Wert von unter 0,05 mit einem nachfolgendem Tukey HSD Test kombiniert wurde, um die Verhältnisse zwischen den Gruppen zu untersuchen. Wenn die Gruppen keine einheitlichen Varianzen besitzen, wurde eine Welch's Varianzanalyse durchgeführt. Konnten innerhalb der Welch's Varianzanalyse signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden, wurde ein Games Howell Test nachfolgend durchgeführt, um die Verhältnisse der einzelnen Gruppen zu untersuchen.

3.1.5 Probit-Analyse

Die Probit-Analyse ist ein statistisches Modell, welches binäre Fälle (0 und 1) mit einer fortlaufenden Variablen in Verbindung bringt. Dabei wird die Gauß'sche Normalverteilungsfunktion ϕ, welche durch die Formel $p = \phi(\alpha + \beta x)$ beschrieben wird, auf die Regression angewendet (Bingham and Fry 2010). Die von Bliss (1934) entwickelte Methode wurde ursprünglich für toxikologische Experimente genutzt, um die tödliche Dosis mathematisch zu bestimmen (Bliss 1934). Aufgrund der gleichen Datenlage lässt sich jedoch dieses mathematische Modell auch verwenden, um das Detektionslimit anhand einer Konzentrationsreihe für ein Nukleinsäure-Amplifikationssystem zu ermitteln. Die Probit-Analyse anhand von Amplifikationsdaten erfolgte mittels einer R-skripts, entwickelt durch Ole Behrmann, beschrieben in Behrmann et al. (2020). Skript modifiziert und an die Daten angepasst durch mich.

3.2 Herstellen der RNA-Standards

Für die Etablierung und Optimierung der RPA-Protokolle ist es nötig, eine definierte Menge amplifizierbarer viraler Nukleinsäure-Moleküle einzusezten, um so eine Vergleichbarkeit zu anderen Protokollen herzustellen. Dafür wurden definierte RNA-Standards der zu amplifizierenden Nukleinsäure hergestellt. Die RNA-Standards für das Influenza A Virus wurden wie in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben hergestellt. Für das Influenza B Virus war in der Arbeitsgruppe schon eine transformierte *E. coli* Kultur vorhanden, weswegen mit dieser erst ab Kapitel 3.2.2 weitergearbeitet wurde.

3.2.1 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Die chemische Transformation von NEB© 5-alpha competent *E. coli* (High Efficiency, New England BioLabs© GmbH) wurde nach Herstellerangaben durchgeführt (Protokoll[4] online verfügbar). Als Vektor dienten synthetisierte Plasmide der Firma Invitrogen (Plasmidkarten siehe Abbildung 11 - 15 im Anhang). Nach der

[4] https://international.neb.com/protocols/0001/01/01/high-efficiency-transformation-protocol-c2987

Transformation wurden jeweils 25 µl des Transformationsansatzes auf zwei mit Ampicillin (Endkonzentration: 100 µg/ml, Roche diagnostics) versetzte LB-Platten (Carl Roth) ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Zur Überprüfung der Transformation wurde eine Kolonie-PCR, eine modifizierte Form der PCR, durchgeführt. Hierbei dient nicht reine DNA, sondern die transformierten Bakterien als Ausgangsmaterial. Durch die Wahl spezifischer Primer, welche das gewünschte Insert innerhalb des Plasmids amplifizieren, kann überprüft werden, ob die Transformation innerhalb der Kultur erfolgreich war (Bergkessel and Guthrie 2013). Für die PCR wurde der Luna© Universal qPCR Master Mix (New England BioLabs) verwendet. Eine halbe Kolonie der transformieren *E. coli* wurde in 20 µl PCR-reinem Wasser (Nuklease- und Nukleinsäure-frei, DEPC behandelt, Carl Roth) suspendiert. Von dieser Suspension wurden 2 µl mit 18 µl PCR-Mix gemischt und eine PCR durchgeführt. Das Temperaturprogramm der PCR ist in Tabelle 2 angegeben. Weitere 5 µl der Suspension wurden auf einer mit Ampicillin versetzten LB-Platte ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert, um eine Folgekultur der überprüften *E. coli* zu erhalten.

Tabelle 2: Temperaturprotokoll für die Kolonie-PCR

Temperatur	Zeit	Zyklen
Zellyse		
95 °C	60s	1x
Amplifikation		
95 °C	10s	45x*
60 °C	30s	
Kühlen		
40 °C	30s	1x

* Messung der Fluoreszenz

3.2.2 Extraktion von Plasmid-DNA aus Übernachtkulturen

Die transformierten Bakterien wurden bei 37 °C und 200 RPM über Nacht in 25 ml Lennox LB-Medium (Carl Roth) kultiviert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem Qiagen Plasmid Midi Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben (Protokoll[5] online verfügbar). Das Prinzip der QIAGEN DNA-Aufreinigung beruht dabei auf einer speziellen alkalischen Lyse der Bakterien kombiniert mit einem Ionen Austausch (QIAGEN 2021). Hierbei wird die negativ geladene DNA an ein positiv geladenes Säulenmaterial wie Diethylaminoethyl (DEAE) Zellulose gebunden (Gautam 2022). Durch in Salzkonzentrationen variierende Puffer kann anschließend die gebundene DNA von Unreinheiten befreit und eluiert werden (Prazeres, Schluep, and Cooney 1998). Die Elution der DNA im letzten Schritt wurde mit 30 µl PCR-reinem Wasser durchgeführt. Eine anschließende Abschätzung der DNA-Konzentration erfolgte mit dem NanoDrop 8000 Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific)

3.2.3 Sequenzierung der isolierten Plasmide

Um die DNA-Sequenz des transformierten Plasmids zu überprüfen, wurde die isolierte Plasmid-DNA mittels Sequenzierung untersucht. Dabei wird der Plasmidabschnitt mit der Virussequenz über eine PCR amplifiziert und mittels der von Sanger, Nicklen, and Coulson (1977) beschriebenen Kettenabbruchmethode mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynucleotiden sequenziert (Mülhardt 2009). Als Primer für die aus Kapitel 3.2.2

[5] https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=0bd0c5fb-c271-43e7-af43-32d539374fa9&lang=en

extrahierte Plasmid-DNA wurde der Vorwärtsprimer M13 (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') und der Rückwärtsprimer M13r (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') verwendet. Die Sequenzierung erfolgte bei der Firma Microsynth Seqlab GmbH.

3.2.4 Restriktionsverdau und Linearisierung von Plasmiden

In Vorbereitung für eine in vitro Transkription zum Erstellen viraler RNA wurde die aus Kapitel 3.2.2 extrahierte Plasmid-DNA linearisiert. Dafür wurden Restriktions-Endonukleasen benutzt, welche innerhalb von spezifischen Erkennungssequenzen den DNA-Doppelstrang schneiden (Smith, n.d.). Für das Influenza B Plasmid (siehe Abbildung 11 im Anhang) wurde das Enzym SacI (Fast Digest, Thermo Fisher Scientific) verwendet. Der Restriktionsverdau erfolgte in 30 µl einfach konzentriertem Fast Digest Puffer (Thermo Fisher Scientific), welcher mit 6 µl Enzym und 3 µl Plasmid-DNA versetzt wurde. Der Restriktionsansatz wurde für 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend bei 65 °C für 5 min inaktiviert. Für die Influenza A Plasmide (siehe Abbildung 12 - 15 im Anhang) wurde das Enzym PshAI (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Der Restriktionsverdau erfolgte in 40 µl einfach konzentriertem Tango Puffer (Thermo Fisher Scientific), welcher mit 3 µg Plasmid-DNA und 1,5 U/µl Enzym versetzt wurde. Der Restriktionsansatz wurde für 2 h im Wasserbad bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 80 °C für 20 min im ThermoStat C (Eppendorf©) inaktiviert. Zur Überprüfung des Restriktionsverdaus wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Sie dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten. Die negativ geladene DNA wandert durch das Anlegen einer Spannung durch ein gitterartiges Trägermaterial (Agarose-Gel) Richtung Anode. Dabei wandern kürzere DNA-Moleküle schneller durch das Trägermaterial als längere, wodurch DNA-Moleküle anhand ihrer Sequenzlänge aufgetrennt werden. Auch verschiedene Plasmidformen wie zirkuläre oder supercoilde Plasmide lassen sich so unterscheiden, da die unterschiedlichen Formen für geringere oder stärkere sterische Beeinträchtigung in der Gittermatrix sorgen. Zur visuellen Detektion der DNA-Fragmente wird die aufgetrennte DNA durch einen Farbstoff markiert (Mülhardt 2009; Schmidt et al. 1999). Als Trägermaterial diente ein Agarosegel mit 1 % (w/v) Agarose in 1X TRIS-Borat-EDTA-Puffer (Roti©fair, Carl Roth) versetzt mit 1,5 µl Green Gel DNA/RNA Stain (Bio & Sell). Pro Geltasche wurden 100 *ng* DNA-Material mit 1 µl 6x orange loading DYE (Thermo Fisher Scientific) in einem finalen Volumen von 6 µl analysiert. Als Referenz wurden jeweils 3 µl einer 100bp plus DNA-Leiter (GeneRuler, Thermo Fisher Scientific) und einer 1 kb DNA-Leiter (PeqGOLD, Thermo Fisher Scientific) mitgeführt. Die angelegte Spannung betrug 80 V für 60 min. Nach der erfolgten Elektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht mithilfe des Geldokumentationssytemes Biorad universal Hood II (Bio-Rad) ausgewertet.

3.2.5 DNA-Aufreinigung des Restriktionsverdaus

Um Puffer- und Enzymbestandteile aus dem fertigen Restriktionsansatz zu entfernen, wurde der Ansatz mithilfe des DNA clean & concentrator Kit (Zymo Research) nach Herstellerangaben aufgereinigt (Protokoll[6] online verfügbar). Die Elution im letzten Schritt des Herstellerprotokolls erfolgte mit 10 µl DNA Elutionspuffer. Anschließend fand eine Abschätzung der DNA-Konzentration mit dem NanoDrop 8000 Spektrophotometer statt.

[6] https://files.zymoresearch.com/protocols/_d4003t_d4003_d4004_d4013_d4014_dna_clean_concentrator_-5.pdf

3.2.6 *In Vitro* Transktription zur Herstellung von viralen RNA-Standards

Die *in vitro* Transkription erfolgte mit dem HiScribe™ T7 High Yield RNA Synthesis Kit (New England BioLabs) nach Herstellerangaben (Protokoll[7] online verfügbar). Pro Reaktion wurde 1 µg verdaute und gereinigte DNA aus Kapitel 3.2.4 eingesetzt. Anschließend wurde die Reaktion für 2 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Um die Anfangs-DNA aus der RNA-Lösung zu entfernen wurde anschließend ein DNAse verdau durchgeführt. Dazu wurde der Mix mit 70 µl PCR-reinem Wasser verdünnt und 10 µl 10x DNAse-Puffer (New England Biolabs) dazugegeben. Die neu entstandene Reaktionslösung wurde mit 4 U DNAse (New England Biolabs) versetzt und abermals bei 37 °C für 15 min inkubiert. Um Puffer- und Enzymbestandteile aus den vorherigen Arbeitsschritten zu entfernen und eine reine RNA-Lösung zu erhalten, wurde das EchoCLEAN RNA CleanUp Kit (BioEcho Life Sciences GmbH) nach Herstellerangaben durchgeführt (Protokoll[8] online verfügbar). Das Prinzip der RNA-Aufreinigungsmethode von BioEcho basiert dabei auf einer Matrix, welche durchlässig für Nukleinsäuren ist, jedoch andere Verunreinigungen bindet (BioEcho 2022).

3.2.7 Ribogreen Assay zur Quantifizierung von RNA

Zur präzisen RNA-Konzentrationsbestimmung wurde das Quant-iT RiboGreen RNA-Kit (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Das Prinzip des Kits basiert dabei auf der Bindung eines gleichnamigen Fluoreszenzfarbstoffes an die RNA. Durch die Bindung erhöht sich die Fluoreszenz des Farbstoffes um das 1000-Fache wodurch eine sensitive Detektion von bis zu 1 ng/ml RNA möglich wird (Jones et al. 1998). Vor der RNA-Konzentrationsbestimmung wurde/wird eine Kalibriergerade im "High-Range" Bereich erstellt. Dazu wurden mit dem im Kit enthaltenen RNA-Standard 5 Kalibrierlösungen im Bereich zwischen 2000 ng/ml und 50 ng/ml mit 1X TE-Puffer (Thermo Fisher Scientific) hergestellt. Die zu messende RNA-Probe wurde vor der Messung mit 1X TE-Puffer auf eine in der Kalibriergerade liegende Konzentration verdünnt. Jede Messlösung der Kalibriergerade sowie zu bestimmende RNA-Lösung wurde 1:1 mit einer Farblösung (RiboGreen 1:200 mit 1X TE-Puffer verdünnt) gemischt. Diese wurde homogenisiert, für 2 min auf Eis im Dunklen gelagert und anschließend abermals gemischt. Die anschließende Fluoreszenzmessung erfolgte im Nanodrop 3300 Fluoreszenzspektrometer bei 525 nm.

3.2.8 Isolation von viraler RNA aus Nasopharyngeal-Abstrichen

Für die Erstellung einer klinischen Kontrollprobe wurden von gesunden Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Nasopharyngeal-Abstriche entnommen und die RNA mithilfe des QiAamp Viral RNA Mini Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert. In die erhaltenen Extrakte wurde in einem 1:10 Verhältnis entsprechende Virus Standard RNA zugegeben.

3.3 Nukleinsäure Amplifikation

3.3.1 Real Time Polymerase Kettenreaktion

Die Amplifikation von viralen Nukleinsäuren mittels PCR wurde mit dem Luna© Universal Probe One-Step RT-qPCR Kit durchgeführt. Pro Reaktion wurden 19 µl Reaktionsmix (siehe Tabelle 3) mit 1 µl Virus-RNA versetzt. Für den in Tabelle 3 angegebenen Primer-Sonden-Mix (PSM) wurden je nach Detektionssystem die für Influenza A (siehe Tabelle 4) bzw. Influenza B (siehe Tabelle 5) beschriebenen Primer und Sonden

[7] https://international.neb.com/protocols/0001/01/01/standard-rna-synthesis-e2040
[8] https://bioecho-prod-media-hp.s3.sbg.perf.cloud.ovh.net/media/e8/6b/93/1650492291/Protocol_EchoCLEANRNACleanupcolumn_001_EN.pdf

verwendet (Immunization and (U.S.) 2021). Die finalen 20 µl Reaktionsmix wurden nach dem in Tabelle 6 angegebenen Temperaturprotokoll im LightCycler© 480 (Roche Holding) gemessen. Für das Hexachlorofluorescein (HEX) Fluorophor wurde im Wellenlängenbereich von ……. gemessen. Die Erfassung des Cyanine 5 (Cy5) Fluorophors erfolgte im Wellenlängenbereich von ….. Die Auswertung der Daten ist in Kapitel 3.1.3 beschrieben.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Influenza PCR-Reaktionsmixes

Bestandteil	Konzentration
2X Luna© Universal Probe One-Step Reaction Mix	1X
20X Luna© WarmStart© RT Enzyme Mix	1X
40X PSM	1X
Virus RNA*	1 µl
PCR-reines Wasser	x µl $\sum$ 20 µl

* Bei Negativkontrollen die Virus RNA mit PCR-reinem Wasser substituiert

Tabelle 4: Zusammensetzung des Influenza A Primer-Sonden-Mixes

Name	Sequenz (5´->3´)	Konzentration	3´-Position	Modifikation
InfA For1	CAAGACCAATCYTGTCACCTCTGAC*	16 µM	156 bp	/
InfA For2	CAAGACCAATYCTGTCACCTYTGAC*	16 µM	156 bp	/
InfA Rev1	GCATTYTGGACAAAVCGTCTACG*	16 µM	261 bp	/
InfA Rev2	GCATTTTGGATAAAGCGTCTACG	16 µM	261 bp	/
InfA-P	TGCAGTCCTCGCTCACTGGGCACG	8 µM	214 bp	Fluorophor: HEX; Quencher: BMN-Q535**

* Y=C oder T; V=A, C oder T ** Modifiziert wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben.

Tabelle 5: Zusammensetzung des Influenza B Primer-Sonden-Mixes

Name	Sequenz (5´->3´)	Konzentration	3´-Position	Modifikation
InfB For	TCCTCAAYTCACTCTTCGAGCG*	16 µM	716 bp	/
InfB Rev	CGGTGCTCTTGACCAAATTGG	16 µM	818 bp	/
InfB-P	CCAATTCGAGCAGCTGAAACTGCGGTG	8 µM	761 bp	Fluorophor: Cy5, Quencher: BMN-Q620**

* Y=C oder T; V=A, C oder T ** Modifiziert wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben.

3.3.2 Rekombinase Polymerase Amplifikation

3.3.2.1 Nukleinsäureamplifikation im 50 µl Ansatz

Für die Amplifikation von Nukleinsäuren mittels RPA wurde das TwistAmp© exo Kit (TwistDX™) verwendet. Die für die RPA verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 7 angegeben. Pro Reaktion wurde 46,5 µl Rehydrationsmix (Zusammensetzung siehe Tab. 8) hergestellt und auf das lyophilisiert RPA-Enzympellet übertragen, um es zu resuspendieren. Die Lösung wurde für ca. 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend gut gemischt. Die resuspendierte RPA-Reaktion (46,5 µl) wurden in eine Kavität eines 8-ter Messstreifens (Carl Roth) übertragen und dieser kurz zentrifugiert. Nachfolgend wurde 1 µl zu amplifizierende Virus RNA bzw. 1 µl PCR reines H_2O (Negativkontrolle) zum Reaktionsmix gegeben, sowie 2,5 µl Magnesium

Tabelle 6: Temperaturprotokoll für die Influenza PCR

Temperatur	Zeit	Zyklen
Reverse Transkription		
55 °C	10 min	1x
95 °C	60 s	
Amplifikation		
95 °C	10 s	45x*
60 °C	30 s	
Kühlen		
40 °C	30 s	1x

* Messung der Fluoreszenz

Acetat (280 mM) in den Deckel der Kavität pipettiert. Zum Start der Reaktion wurde der Messstreifen kurz zentrifugiert und homogenisiert, um das Magnesium Acetat in den Reaktionsmix einzubringen. Die Messung erfolgte nach einer ein minütigen Equilibrationszeit im ESEQuant TS2.4 (Qiagen) bei 38-42 °C. Je nach Versuch wurde die Messung für ein zusätzliches Mischen unterbrochen.

Tabelle 7: Entwickelte Primer und Sonden für die Recombinase Polymerase Amplifikation

Name	Sequenz (5´->3´)	3´-Position	Modifikation
Influenza B			
InfB Forward 1	TTGAATGCATATGACCAGAGTGGAAGGCTT	625 bp	/
InfB Reverse 1.1	CCTTCATTAAGACGCTCGAAGAGTGAATTG	749 bp	/
InfB Sonde 1.1	GCTAAACTTGTTGCTACTGATGATCTTACAG 12 G 3 AGGATGAAGAAGATGG	658 bp	Fluorophor: FAM Quencher: BMQ-535**
InfB Sonde 1.1 rev-Strang	CCATCTTCTTCATCCTCCACTGTAAGATCA 12 A 3 GTAGCAACAAGTTTAGC	707 bp	Fluorophor: FAM Quencher: BMQ-535**
Influenza A			
InfA Forward 1	AACACAGATCTTGAGGCTCTCATGGAATGGY*	119 bp	/
InfA Reverse 1	CGTCTACGCTGCAGTCCTCGCTCACTGGGCA	246 bp	/
InfA Sonde 1	TCATGGAATGGCTAAAGACAAGACCAA 12 Y 3 TGTCACCTCTGACTAAGGG*	138 bp	Fluorophor: FAM/Atto-565 Quencher: BMQ-535**

* Y=C oder T; 1: Repoterfluorophor; 2: a-basische Seite; 3: Quencher ** Modifiziert wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben.

Tabelle 8: Zusammenstzung des Rehydrationsmixes

Bestandteil	Konzentration	Modifikation
Forward Primer	0,45 µM	biomers.net GmbH
Reverse Primer	0,45 µM	biomers.net GmbH
Sonde	0,13 µM	biomers.net GmbH
RevertAid Reverse Transkriptase	10,75 U/µl	Thermo Fisher Scientific
RNase Inhibitor, Murine	1,08 U/µl	New England Biolabs
Rehydrations Puffer	29,5 µl	TwistDX
PCR reines Wasser	x µl $\sum$ 46,5 µl	/

* Bei Negativkontrollen die Virus RNA mit PCR-reinem Wasser substituiert

3.3.2.2 Nukleinsäureamplifikation im 8-tel Ansatz

kurze Einleitung, dass die RPA auch im 8-tel Ansatz geht. (kommt darauf an, was ich in der Einleitung/theoretischem Hintergrund dazu schreibe)

Für 8 Reaktionen wurde insgesamt 40,8 µl Rehydrationsmix (Zusammensetzung siehe Tab. 9) hergestellt und auf das lyophilisiert RPA-Enzympellet übertragen, um es zu resuspendieren. Die Zusammensetzung des in Tabelle 9 aufgeführten 50X PSM´s ist in Tabelle 10 gezeigt. Die Lösung wurde für ca. 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend gut gemischt. Die resuspendierte RPA-Reaktion wurden auf einen 8-ter Messstreifens aufgeteilt (4,8 µl pro Kavität) und dieser kurz zentrifugiert. Nachfolgend wurden jeweils pro Kavität 1 µl zu amplifizierende Virus RNA bzw. 1 µl PCR reines H_2O (Negativkontrolle) zum Reaktionsmix gegeben. Darauffolgend wurden 15 µl Mineralöl Hersteller, welches die Evaporation des Reaktionsmixes während der Messung verhindert, in den Deckel jeder Kavität pipettiert. Als Letztes wurden 0,64 µl Magnesium Acetat (140mM) an die Innenseite der Kavität pipettiert. Zum Start der Messung wurde der Messstreifen kurz zentrifugiert und homogenisiert um das Magnesium und das Mineralöl in den Reaktionsmix einzubringen. Es folgte eine erneute Zentrifugation, um die Öl-Phase von der wässrigen Phase zu trennen. Die Messung erfolgte nach einer einminütigen Equilibrationszeit im ESEQuant TS2.4 (Qiagen) bei 38-42 °C. Je nach Versuch wurde die Messung für ein zusätzliches Mischen unterbrochen.

Tabelle 9: Zusammenstzung des Rehydrationsmixes für den 8-tel Ansatz

Bestandteil	Konzentration	Hersteller
50X PSM	1,35x	/
RNase Inhibitor, Murine	1,37 U/µl	Thermo Fisher Scientific
RevertAid Reverse Transkriptase	13,73 U/µl	New England Biolabs
Rehydrations Puffer	29,5 µl	TwistDX
PCR reines Wasser	x µl $\sum$ 40,8 µl	/

Tabelle 10: Zusammenstzung des Primer-Sonden-Mixes für den 8-tel Ansatz

Bestandteil	Konzentration	Hersteller
Vorwärtsprimer	21 µM	Biomers
Rückwärtsprimer	21 µM	Biomers
Sonde	6 µM	Biomers

4 Ergebnisse

4.1 Entwicklung eines Rekombinase Polymerase Amplifikationssystems für das Influenza A Virus

4.1.1 Herstellung der Influenza A Virus Standard-RNA

Für die Durchführung und den Vergleich von verschiedenen Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren, ist es nötig, standardisierte Virus-RNA mit einer definierten Konzentration herzustellen. Dabei dient ein DNA-Plasmid mit der entsprechenden Virus-Sequenz als Ausgangsmaterial. Dieses wurde in *E. coli* transformiert, durch Kultivierung vermehrt und anschließend mittels verschiedener Methoden zur gewünschten Virus-RNA transkribiert.

Um die Gruppe der Influenza A Viren ausreichend abdecken zu können wurden RNA-Standards von den akutell vorherrschenden Subtypen H1N1 und H3N2 erstellt. Damit die Detektion von älteren Varianten der beiden Subtypen untersucht werden kann, wurden zusätzlich RNA-Standards von früher dominanten Subtypen hergestellt. Für den H1N1-Subtyp wurde dabei eine DNA-Sequenz aus dem Jahr 2004 und für den H3N2-Subtyp eine Sequenz aus dem Jahr 2005 als Vorlage verwendet. Alle nachfolgenden Schritte dieses Kapitels wurden für alle vier RNA-Standards gleich durchgeführt.
Für die Erstellung der Standard-RNA's wurden im ersten Schritt die entsprechenden Virus DNA-Sequenzen als teil eines DNA-Plasmids nach beschriebener Methode (siehe Kapitel 3.2.1) in *E. coli* transformiert. Anschließend wurden die transformierten Bakterien, wie in Kapitel 3.2.2 angegeben kultiviert und die Plasmid-DNA isoliert. Durch eine anschließende Sequenezierung konnten Sequenzfehler durch Mutationen ausgeschlossen werden. Im nächsten Schritt wurden die isolierten Plasmide durch einen Restriktionsverdau linearisiert und somit für die *in vitro* transkription vorbereitet. Der Restriktionsverdau wurde wie in Kapitel 3.2.4 angegeben durchgeführt. Die zur Überprüfung der erfolgreichen linearisierung durchgeführten Agarose-Gele sind in Abbildung 4 gezeigt. Alle verdauten Plasmide zeigen eine DNA-Bande bei ~ 3300 bp. Die ungeschnittenen mitgeführten Kontrollplasmide aus der vorherigen Plasmid-DNA isolation weisen hingegen eine Bande zwischen 5000 bp und 6000 bp auf. Eine Ausnahme bildet hierbei das Kontrollplasmid auf der Gelspur 5, da keine DNA-Bande sichtbar ist.

Zur Weiteren Vorbereitung der linearisierten Plasmid-DNA für die *in vitro* Transkription und als Nachbehandlung von den Restriktionsverdau wurden die verdauten Plasmide nach der in Kapitel 3.2.5 beschriebenen Methode von Enzym- und Pufferrückständen entfernt. Die gereinigte DNA wurde im nächsten Schritt mithilfe der in Kapitel 3.2.6 angegeben Methode zu RNA reverse Transkribiert und die Ausgangs-DNA beseitigt. In der nachfolgenden Aufreinigung wurde die Nukleinsäure abermals von störenden Puffer und Enzymrückständen befreit. Die reine, artifiziell erstellte virale RNA wurde im letzten Schritt nach mithilfe des Ribogreen-Assays quanitifiziert (siehe Methode unter Kapitel 3.2.7). Dabei wurden jeweils die RNA-Standards H3N2 (2005) und H1N1 (2020) innerhalb einer Messung und die Standards H1N1 (2004) und H3N2 (2020) in einem seperaten Assay quantifiziert. Die Kalibriergeraden der Assays sind in Abbildung reffig:infAverdau gezeigt. Beide Kalibriergeraden besitzen einen Korrelationskoeffizienten (R) von 1 und einen p-Wert von » 0,05. Daraus lässt sich ein starker linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und Fluoreszenz erkennen. Mithilfe der angegeben Geradengleichungen von $y = -190+3,8x$ und $y = -190+3,8x$ für die jeweiligen Messungen konnten die Konzentrationen der gemessenen viralen RNA-Standards berechnet werden. Die Mittelwerte von jeweils 5 Messungen pro Standard sind zusammen mit den daraus resultierenden Kopie-Zahlen der einzelnen RNA-Moleküle/µl in Tabelle 11 angegeben.

Abbildung 4: **Kontrollgel des Restriktionsverdaus und Ribogreen Kalibrationsgeraden der Influenza A Plasmide**: **A**: DNA-Banden des Kontrollgels für den Restriktionsverdau der Influenza A Plasmide. DNA-Banden des verdautem Plasmid des 2005 H3N2 Standards (2) mit unverdauter Kontrolle (3), verdautem Plasmid des aktuellem H1N1 Standards (4) mit unverdauter Kontrolle (5) sowie verdautem Plasmid des aktuellen H3N2 Standard (6) mit unverdautem Kontrollplasmid (7), sowie mitgeführte 100 bp plus DNA-Leiter (8) und 1000 bp DNA-Leiter (1). DNA-Banden des verdautem Plasmid des 2004 H1N1 Standards (2) mit unverdautem Kontrollplasmid (3) und mitgeführter 100 bp plus DNA-Leiter (1). Bilder digital bearbeitet. **B, C** Kalibrationsgeraden des Ribogreen-Assays mit angefügter Geradengleichung, Korrelationskoeffizienten und p-Wert. Das graue Band zeigt das 95 %-ige Konfidenzintervall der linearen Funktion. Alle Messungen wurden mit n=5 durchgeführt.

Tabelle 11: Quantifizierung der Influenza A RNA-Standards

RNA-Standard	Mittelwert der Konzentration	RNA-Kopien pro µl
H1N1 (2020)	365,3 ± 32,4 ng/ml	$2{,}0*10^8$
H3N2 (2020)	247,9 ± 22,1 ng/ml	$1{,}4*10^8$
H1N1 (2004)	197,9 ± 33,2 ng/ml	$1{,}0*10^8$
H3N2 (2005)	173,9 ± 11,5 ng/ml	$9{,}6*10^7$

4.1.2 Entwicklung von spezifischen Primern und Sonden für das Influenza A Virus

Mithilfe der in Kapitel 3.1.1 beschriebenen Methode konnten für das Influenza A Virus insgesamt 8 verschiedene Primer-Sonden-Kombinationen im Bereich zwischen 20 bp und 248 bp entwickelt werden. Durch die Einführung von degenerierten Basen in die Oligonukleotide wurden übermäßige Basenfehlpaarungen bei dem Alingment an die unterschiedlichen DNA-Sequenzen der beiden Subtypen H1N1 und H3N2 vermieden. Dabei wurden nicht mehr 3 Fehlpaarungen pro Oligonukleotid erreicht. Zusätzlich konnten vermieden werden, dass diese an dem für die Amplifikation benötigten 3´-Ende sitzen. Alle Kombinationen wurden mit 10^7 Kopien des viralen RNA-Standards des aktuellen H3N2 Subtypes in einer Dreifachbestimmung (n=3) auf Amplifikation getestet. Dabei konnte keine Variante eine zufriedenstellende Amplifikation vorweisen, wie in Abbildung **??** im Anhang zu sehen.

4.2 Entwicklung eines Rekombinase Polymerase Amplifikationssystems für das Influenza B Virus

kleiner Einleitungstext… (kommt darauf an, was ich in der Einleitung/theoretischem Hintergrund dazu schreibe)

4.2.1 Rekombinase Polymerase Amplifikation-Primerdesing für das Influenza B Virus

Für das Influenza B Virus konnten nach der beschriebenen Methode (siehe 3.1.1) insgesamt 10 verschiedene Primer-Sonden-Kombinationen gefunden werden. Davon befanden sich 2 Kombinationen im Bereich zwischen 625-756 Basenpaare und 8 im Bereich von 443-615 Basenpaare. Diese wurden in einer Dreifachbestimmung (n=3) nach Methode 3.3.2.1 getestet. Dabei zeigte das Primer-Sonden-Paar, welches in Tabelle 7 beschrieben ist, die besten Ergebnisse. Dieses Primer-Sonden-Set wurde für alle weiteren Rekombinase Polymerase Amplifikationen innerhalb dieses Abschnitts verwendet. Der Amplifikationsbereich liegt dabei zwischen 625 und 749 Basenpaaren.

4.2.2 Herstellung der Influenza B Virus Standard-RNA

Für die Durchführung und den Vergleich von verschiedenen Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren, ist es nötig, standardisierte Virus-RNA mit einer definierten Konzentration herzustellen. Dabei diente ein DNA-Plasmid mit der entsprechenden Virus-Sequenz als Ausgangsmaterial. Dieses wurde in *E. coli* transformiert, durch Kultivierung vermehrt und anschließend mittels verschiedener Methoden zur gewünschten Virus-RNA transkribiert.

Da für das Influenza B Virus innerhalb der Arbeitsgruppe schon eine transformierte Bakterienkolonie vorhanden war, konnte direkt eine Kultivierung mit anschließender Plasmid-Extraktion nach beschriebener Methode

(siehe Kapitel 3.2.2) erfolgen. Durch eine Sequenzierung (siehe 3.2.3) konnten mögliche Sequenzfehler der extrahierten DNA ausgeschlossen werden.

Der anschließende Restriktionsverdau (siehe Kapitel 3.2.4) diente dazu, das Plasmid zu linearisieren und somit für die in vitro Transkription vorzubereiten. Das Kontrollgel ist in Abbildung 5 gezeigt. Die darin enthaltenen DNA-Banden zeigen unterschiedliche Größen, wobei das verdaute Plasmid deutlich unter dem unverdauten Kontrollplasmid liegt. Um mit der verdauten DNA weiterzuarbeiten, mussten Puffer und Enzymrückstände vom Restriktionsverdau entfernt werden. Dazu wurde der Restriktionsansatz nach beschriebener Methode (siehe Kapitel 3.2.5) gereinigt.

Abbildung 5: **Kontrollgel und Ribogreen Kalibrationsgerade der Influenza B Standardherstellung: A:** DNA-Banden des Kontrollgels für den Restriktionsverdau des Influenza B Plasmids mit verdautem Plasmid (2), unverdautem Kontrollplasmid (3) und mitgeführter DNA-Leiter (1). Das linearisierte Plasmid läuft bei ca. 3300 bp und somit unter dem mitgeführten ungeschnittenem Kontrollplasmid. Das Kontrollplasmid zeigt keine klare Bande. Bild ist digital bearbeitet. **B:** Kalibrationsgerade des Ribogreen-Assays mit angefügter Geradengleichung, Korrelationskoeffizienten und p-Wert. Das graue Band zeigt das 95 %-ige Konfidenzintervall der linearen Funktion. Alle Messungen wurden mit n=4 durchgeführt.

Die Herstellung der Virus-RNA wurde, wie in Kapitel 3.2.6 mit dem linearisierten Plasmid beschrieben durchgeführt und im Anschluss mit dem Ribogreen-Assay nach beschriebener Methode (siehe Kapitel 3.2.7) quantifiziert. Die Kalibrationsgerade des Assays ist in Abbildung 5 gezeigt. Die Kalibrierung ergab eine Geradengleichung von $y = 22 + 3,6x$ mit einem Korrelationskoeffizient R = 0.99. Anhand dieser Geradengleichung konnte die hergestellte RNA in einer Fünffachbestimmung (n=5) quantifiziert werden. Der Influenza B Virus RNA-Standard besitzt eine Konzentration von $476.0 \pm 7,8$ ng/ml und somit eine Kopienanzahl von rund $2,2 * 10^8$ Kopien/µl.

4.2.3 Ermittlung der Sensitivität der Influenza B PCR

Zur Überprüfung der Sensitivität und um ein etabliertes Amplifikationssystem zum Vergleich heranziehen zu können, wurde das in Kapitel 3.3.1 gezeigte Influenza B PCR-System auf die Sensitivität getestet. Dazu wurde der in Kapitel 4.2.2 hergestellte Standard auf $2 * 10^7$ Kopien/µl verdünnt und in dekadischen Verdünnungsstufen bis zu $2 * 10^0$ in jeweils einer Mehrfachbestimmung (n=7) auf eine Amplifikation nach beschriebener Methode 3.3.1 untersucht. Die normalisierten Fluoreszenzwerte der Amplifikationen sowie der lineare Zusammenhang der Ct-Werte (ermittelt nach der in 3.1.3 beschriebenen Methode) sind in Abbildung 6A und B gezeigt. Für die Ermittlung der Sensitivität wurden die Amplifikationsergebnisse in das in Kapitel

3.1.5 beschriebene R-Skript eingefügt. Die berechnete Sensitivitätsgrenze bei einer 95 %-igen Wahrscheinlichkeit liegt bei 11,3 Kopien (siehe Abbildung 6C).

Abbildung 6: **Sensitivitätsanalyse der Influenza B PCR: A:** Amplifikationsgraphen der Influenza B PCR bei verschiedenen Konzentrationen (n=7). **B:** Linearer Zusammenhang der Ct-Werte über die Konzentration mit angefügter Geradengleichung, Korrelationskoeffizienten und p-Wert. Das graue Band zeigt das 95 %-ige Konfidenzintervall der linearen Funktion. Ct-Werte negativer Amplifikationen wurden vernachlässigt und sind nicht gezeigt. **C:** Probit-Analyse der Amplifikationsdaten. Die schwarz durchgezogene Linie zeigt, die Probit-Regression der PCR. Die schwarzen gestreiften Linien beschreiben das oberer und untere 95 %-ige Konfidenzintervall der Probit-Regression. Die rot gestreifte Linie zeigt die ermittelte Sensitivitätsgrenze, bei welcher 95 % der Amplifikationen positiv sind.

4.2.4 Etablierung der Influenza B Rekombinase Polymerase Apmlifikations-Assays

Um das in Kapitel 4.2.1 getestete Primer-Sonden-Set zu etablieren, wurde eine RPA im Original-Volumen (50 µl) nach der beschriebenen Methode (siehe Kapitel 3.3.2.1) und eine RPA im 8tel-Ansatz (Methode siehe Kapitel 3.3.2.2) mit jeweils 10^6 Virus RNA Kopien/µl durchgeführt. Die Amplifikation wurde bei 40 °C durchgeführt. Eine Unterbrechung der Messung durch einen Mischschritt fand nicht statt. Die normalisierten Fluoreszenzdaten sind in Abbildung 7 gezeigt. Es ist zu erkennen, dass die 8tel RPA im Vergleich zu der 50 µl RPA im Verlauf der Reaktion an maximaler Intensität verliert. Um die Anstiegszeiten der beiden RPA-Reaktionstypen zu vergleichen, wurden die nach Kapitel 3.1.3 ermittelten TT-Werte mit der in Kapitel 3.1.4 beschriebenen Methode untersucht. Es konnte kein signifikanter Unterschied der Anstiegszeit zwischen den beiden Reaktionstypen festgestellt werden (siehe Tabelle 12 im Anhang).

Abbildung 7: **Etablierung der Influenza B RPA im Original- und 8tel-Ansatz:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der 50µl RPA (n=3) und der 8tel RPA (n=6). Messung bei 40 °C ohne Unterbrechung durch einen Mischschritt. Messung mit jeweils 10^6 Virus-RNA-Molekülen/µl als Ausgangsmaterial

4.2.5 Optimierung der Influenza B Rekombinase Polymerase Amplifikation

Um die Influenza B RPA zu optimieren, wurden die Reaktionsparameter Mischzeit und Reaktionstemperatur untersucht, um die bestmöglichen Reaktionsbedingungen zu ermitteln. Des Weiteren wurde in Kapitel **??** gezeigt, dass eine erhöhte Reverseprimer-Konzentration bessere Amplifikation zur Folge hat. Aus diesem Grund wurde die Primer-Konzentration als weiterer Optimierungsparameter untersucht.
Wie in Abbildung 8A zu sehen, weist die Reaktion bei 38 °C einen späteren Anstieg des Fluoreszenzsignals und somit signifikant höhere TT-Werte (siehe Tabelle 13) auf als bei 40 °C oder 42 °C. Zwischen 40 °C und 42 °C konnten keine signifikanten Unterschiede bei den TT-Werten festgestellt werden. Des Weiteren weist die RPA bei 38 °C Reaktionstemperatur im späteren Verlauf der Reaktion die niedrigste Fluoreszenzintensität auf. Die Reaktion bei 42 °C zeigt ebenfalls eine niedrigere Fluoreszenzintensität als Messung bei 40 °C. Zusätzlich lässt sich bei 42 °C eine weitere Abnahme des Fluoreszenzsignals nach ~ 13 Minuten beobachten. Das gleiche Phänomen tritt ebenfalls bei 40 °C Reaktionstemperatur auf, jedoch erst später ab ~ 15 Minuten und nur bei 4 von 6 Reaktionen. Alle Reaktionen wurden nach beschriebener Methode (siehe Kapitel 3.3.2.2) ohne eine Unterbrechung der Messung durch einen Mischschritt durchgeführt.
Bei der Optimierung der Mischzeit (Fluoreszenzdaten in Abbildung 10 im Anhang) konnte beobachtet werden, dass bei Konzentrationen von 10^3 Virus RNA-Molekülen ein zusätzlicher Mischschritt bei 3 oder 4 Minuten eine geringe, aber signifikante Verringerung des TT-Wertes zur Folge hat (siehe Tab. 15 im Anhang). Signifikante Veränderungen des TT-Wertes konnten innerhalb der unterschiedlichen Mischzeiten nicht beobachtet werden. Ebenfalls konnten keine Unterschiede in der Fluoreszenzintensität am Ende der Messung sowohl bei den getesteten Mischzeiten als auch bei der Referenzmessung ohne zusätzlichen Mischschritt festgestellt werden. Bei 10^1 Amplifikaten/µl als Ausgangsmaterial zu Beginn der Messung zeigte ein Mischschritt nach 5 Minuten eine Verbesserung der Amplifikation (siehe Abbildung 10A und B im Anhang). Bei der Auswertung der Fluoreszenzdaten nach der beschriebenen Methode (siehe Kapitel 3.1.3) konnte die Anzahl der

positiven Amplifikationen von 3/7 (ohne Mischschritt) auf 7/7 (zusätzlicher Mischschritt nach 5 Min.) erhöht werden.
Die Fluoreszenzdaten der Optimierung der Primer-Konzentration sind in Abbildung 8B gezeigt. Es ist zu erkennen, dass eine Erhöhung der Reverseprimer-Konzentration auf 1,5X mit einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität einhergeht. Bei einer weiteren Erhöhung auf eine doppelte Reverseprimer-Konzentration ist ein Abfall der Fluoreszenz bei ~ 12 Minuten bei 4 von 6 Reaktionen zu beobachten. Es konnte keine signifikante Veränderung des TT-Wertes bei den untersuchten Primer-Konzentration festgestellt werden (siehe Tab. 14 im Anhang). Alle Messung wurden nach beschriebener Methode (siehe Kapitel 3.3.2.2) bei 40 °C und ohne zusätzlichen Mischschritt durchgeführt.

Somit konnten als Parameter für die folgenden Messungen ein Temperaturoptimum von 40 °C, ein zusätzlicher Mischschritt bei 5 Minuten und eine 1,5X erhöhte Reverseprimer-Konzentration als Optimal herausgefunden werden.

Abbildung 8: **Einfluss der Temperatur und der Primerkonzentration auf die Influenza B RPA: A**: Normalisierte Fluoreszenzdaten der Influenza B RPA bei 3 verschiedenen Temperaturen in n=6 mit jeweils 10^6 Amplifikaten/µl als Ausgangsmaterial. Assay im 8tel-Ansatz durchgeführt. Messung ohne zusätzlichen Mischschritt durchgeführt. **B**: Normalisierte Fluoreszenzdaten der Influenza B RPA bei verschiedenen Reverseprimer-Konzentrationen in n=6 mit jeweils 10^6 Amplifikaten/µl als Ausgangsmaterial. RPA im 8tel-Ansatz durchgeführt. Messung bei 40 °C und ohne zusätzlichen Mischschritt. Als Referenz (Blau) wurde die RPA mit unveränderter Primer-Konzentration mitgeführt.

4.2.6 Ermittlung der Sensitivität der Influenza B Rekombinase Polymerase Amplifikation

Um die optimierte Influenza B RPA zu charakterisieren, wurde eine Sensitivitätsmessung durchgeführt, um die minimal detektierbaren viralen RNA-Moleküle zu ermitteln. Dazu wurde der in 4.2.2 hergestellte Standard auf $2 * 10^7$ Kopien/µl verdünnt und in dekadischen Verdünnungsstufen bis zu $2 * 10^0$ in jeweils einer Mehrfachbestimmung von n=7 auf eine Amplifikation getestet. Dabei wurde jeweils die Verdünnungsreihe innerhalb der 50 µl RPA (Methode siehe Kapitel 3.3.2.1) und der 8tel RPA (Methode siehe Kapitel 3.3.2.2) gemessen. Die beiden Systeme wurden dabei mit den in Kapitel 4.2.5 angegebenen optimalen Reaktionsparametern durchgeführt. Eine Unterbrechung der Messung durch einen Mischschritt nach 5 Minuten erfolgte in der 50 µl RPA bei RNA-Konzentrationen von 10^4 Molekülen/µl und niedriger. Bei der 8tel RPA wurde die Messung durch den benannten Mischschritt bei 10^2 Molekülen/µl und niedriger unterbrochen. Die normalisierten Fluoreszenzdaten der Amplifikationen sind in Abbildung 9A und B gezeigt. Die Auswertung der Daten wurde mit der in Kapitel 3.1.3 beschriebenen Methode durchgeführt. Die ermittelten TT-Werte sowie

deren linearer Zusammenhang bei verschiedenen Konzentrationen sind für beide Assays im Anhang unter Abbildung @ref(fig:..) gezeigt. Für die 50 µl RPA konnte eine Geradengleichung von $y = 11 - 1,3x$ mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,93$ ermittelt werden. Die 95 %ige Detektionswahrscheinlichkeit liegt hier, wie in Abbildung 9C gezeigt, bei 31,6 RNA-Molekülen. Für die 8tel RPA konnte eine Detektionsgrenze von 14,6 Kopien ermittelt werden (siehe Abbildung 9D. Um die in Abbildung 9B gezeigten Ausreißer der TT-Werte aus dem linearen Zusammenhang zu entfernen, wurde der in Kapitel 3.1.4 beschriebene Ausreißertest für die jeweiligen Konzentrationen durchgeführt. Somit konnte eine Geradengleichung von $y = 9,4 - 0,95x$ mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,92$ berechnet werden.

Zusätzlich wurde für die 8tel RPA eine dekadische Konzentrationsreihe ab $2 * 10^4$ RNA-Kopien/µl abwärts in einem humanen RNA-Probenhintergrund gemessen (n=6), um die Sensitivität unter klinisch simulierten Bedingungen zu ermitteln. Dazu wurden die untersuchten Proben wie in Kapitel 3.2.8 beschrieben hergestellt. Alle Messungen wurden mit den in Kapitel 4.2.5 angegebenen optimalen Reaktionsparametern durchgeführt. Als weitere Negativkontrolle wurde der RNA-Extrakt ohne zugesetzte Virus-RNA mitgeführt. Alle Proben mit einer Konzentration von $2 * 10^3$ Virus RNA Molekülen konnten detektiert werden (siehe Abbildung **??** im Anhang). Bei 10^2 RNA-Molekülen konnte keine Probe als Positiv detektiert werden. Als neue 95 %-ige Detektionsgrenze konnten 1397 Kopien errechnet werden. Somit lässt sich ein Verlust an Sensitivität in dem simulierten humanen RNA-Probenhintergrund feststellen. Eine Kreuzreaktivität mit humaner Proben-RNA konnte nicht beobachtet werden.

4.2.7 Ermittlung der Spezifität der Influenza B Rekombinase Polymerase Amplifikation

Abbildung 9: **Sensitivitätsanalyse der Influenza B RPA:** Messungen mit den in Kapitel 4.2.5 beschriebenen optimalen Reaktionsparametern durchgeführt. Der zusätzliche Mischschritt wurde je nach Assay bei verschiedenen Konzentrationen mitgeführt. **A**: Sensitivitätsreihe in der 50 µl RPA. **B**: Sensitivitätsreihe in der 8tel RPA. Die roten Pfeile zeigen Ausreißer bei 10^7 und 10^4 Molekülen/µl. **C**: Probit-Analyse der Fluoreszenzdaten von der 50 µl RPA. Die schwarz durchgezogene Linie zeigt, die Probit-Regression der PCR. Die schwarzen gestreiften Linien beschreiben das oberer und untere 95 %-ige Konfidenzintervall der Probit-Regression. Die rot gestreifte Linie zeigt die ermittelte Sensitivitätsgrenze, bei welcher 95 % der Amplifikationen positiv sind. **D**: Probit-Analyse der Fluoreszenzdaten der 8tel RPA. Die Bedeutung aller Linien ist gleich für Bild C.

4.3 Entwicklung eines Rekombinase Polymerase Amplifikationssystems für das Influenza A Virus

kleiner Einleitungstext… (kommt darauf an, was ich in der Einleitung/theoretischem Hintergrund dazu schreibe) Mit H1N1 und H3N2 erwähnen als Subtypen

4.3.1 Rekombinase Polymerase Amplifikation-Primerdesing für das Influenza B Virus

5 Anhang

Abbildung 10: **Einfluss verschiedener Mischzeitpunkte auf die Influenza B RPA :** normalisierte Fluoreszenzdaten (n=7) der Influenza B RPA bei 10^1 RNA-Molekülen/µl ohne zusätzlichen Mischschritt (**A**) und mit einem Mischschritt nach 5 Minuten (**B**). Assay im 8tel Ansatz durchgeführt. **C**: normalisierte Fluoreszenzdaten der Influenza B RPA bei verschiedenen Mischzeitpunkten und einer RNA-Ausgangskonzentration von 10^3 Molekülen/µl. Messung im 8tel Ansatz und in Mehrfachbestimmung (n=6) durchgeführt.

Tabelle 12: Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 7

Gruppe 1	Gruppe 2	Mittelwert Gr. 1	Mittelwert Gr. 2	T-Wert	Freiheitsgrad	p-wert	Aussage
50 µl RPA	8 µl RPA	3,36 ± 0.01	3,47 ± 0.14	1,92	n=9	0,109	ns

Notiz: ns = nicht Signifikant
* p = <0.05 ** p = <0.01 *** p = <0.001

Tabelle 13: Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 8A

Gruppe	Werte	Mittelwert	Shapio-Wilk-Test	Levene-Test	Anova-Test
38 °C	n=5	5,26 ± 0,06	p = 0,93		
40 °C	n=6	3,57 ± 0,20	p = 0,44	p = 0,10	p = 2,89 *10^{-10}
42 °C	n=6	3,63 ± 0,13	p = 0,16		
Vergleich der Gruppen					
Gruppe 1	Gruppe 2	untr. Konfid.	obrs. Konfid.	p-wert	Aussage
38 °C	40 °C	$-1,94$	$-1,43$	p = 6,29 *10^{-10}	s ***
38 °C	42 °C	$-1,89$	$-1,38$	p = 9,13 *10^{-10}	s ***
40 °C	42 °C	$-0,18$	$0,28$	p = 0,81	ns

Notiz: ns = nicht Signifikant; s= signifikant; untr.Konfid. = unteres Konfidenzintervall; obrs.Konfid. = oberes Konfidenzintervall * p = <0.05 ** p = <0.01 *** p = <0.001

Tabelle 14: Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 8B

Gruppe	Werte	Mittelwert	Shapio-Wilk-Test	Levene-Test	Anova-Test
Referenz	n=6	3,39 ± 0,07	p = 0,46		
1,5X Rev.	n=5	3,43 ± 0,07	p = 0,39	p = 0,11	p = 0,62
2X Rev.	n=6	3,45 ± 0,17	p = 0,64		

Tabelle 15: Mathematische Daten des TT-Wert Vergleichs für Abbildung 10C

Gruppe	Werte	Mittelwert	Shapio-Wilk-Test	Levene-Test	Anova-Test
ohne Mischen	n=5	6,00 ± 0,15	p = 0,13		
Mischen (3 min)	n=6	5,13 ± 0,21	p = 0,15	p = 0,21	p = 2 *10^{-3}
Mischen (4 min)	n=5	5,11 ± 0,30	p = 0,92		
Vergleich der Gruppen					
Gruppe 1	Gruppe 2	untr. Konfid.	obrs. Konfid.	p-wert	Aussage
Mischen (3 min)	Mischen (4 min)	$-1,02$	$0,32$	p = 0,38	ns
Mischen (3 min)	ohne Mischen	$0,16$	$1,51$	p = 0,02	s *
Mischen (4 min)	ohne Mischen	$0,48$	$1,89$	p = 1,74 *10^{-3}	s **

Notiz: ns = nicht Signifikant; s= signifikant; untr.Konfid. = unteres Konfidenzintervall; obrs.Konfid. = oberes Konfidenzintervall * p = <0.05 ** p = <0.01 *** p = <0.001

Abbildung 11: **Plasmidkarte des Influenza B Plasmides für den Influenza B RNA-Standard**

Abbildung 12: **Plasmidkarte des Influenza A Plasmides für den Influenza H3N2 (2005) RNA-Standard**

Abbildung 13: **Plasmidkarte des Influenza A Plasmides für den Influenza H1N1 (2004) RNA-Standard**

Abbildung 14: **Plasmidkarte des Influenza A Plasmides für den Influenza H3N2 (2020) RNA-Standard**

Abbildung 15: **Plasmidkarte des Influenza A Plasmides für den Influenza H1N1 (2020) RNA-Standard**

Literaturverzeichniss

Aranha, Clara, Vainav Patel, Vikrant Bhor, and Dimpu Gogoi. 2021. "Cycle Threshold Values in RT-PCR to Determine Dynamics of SARS-CoV-2 Viral Load: An Approach to Reduce the Isolation Period for COVID-19 Patients." *Journal of Medical Virology* 93 (12): 6794–97. https://doi.org/10.1002/jmv.27206.

Arranz, Rocío, Rocío Coloma, Francisco Javier Chichón, José Javier Conesa, José L. Carrascosa, José M. Valpuesta, Juan Ortín, and Jaime Martín-Benito. 2012. "The Structure of Native Influenza Virion Ribonucleoproteins." *Science* 338 (6114): 1634–37. https://doi.org/10.1126/science.1228172.

Bachman, Julia. 2013. "Reverse-Transcription PCR (RT-PCR)." In *Laboratory Methods in Enzymology: RNA*, 67–74. Elsevier. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-420037-1.00002-6.

Bai, Chongzhi, Qiming Zhong, and George Fu Gao. 2021. "Overview of SARS-CoV-2 Genome-Encoded Proteins." *Science China Life Sciences* 65 (2): 280–94. https://doi.org/10.1007/s11427-021-1964-4.

Behrmann, Ole, Iris Bachmann, Martin Spiegel, Marina Schramm, Ahmed Abd El Wahed, Gerhard Dobler, Gregory Dame, and Frank T Hufert. 2020. "Rapid Detection of SARS-CoV-2 by Low Volume Real-Time Single Tube Reverse Transcription Recombinase Polymerase Amplification Using an Exo Probe with an Internally Linked Quencher (Exo-IQ)." *Clinical Chemistry* 66 (8): 1047–54. https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa116.

Bergkessel, Megan, and Christine Guthrie. 2013. "Colony PCR." In *Methods in Enzymology*, 299–309. Elsevier. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-418687-3.00025-2.

Bingham, N. H., and John M. Fry. 2010. *Regression*. Springer London. https://doi.org/10.1007/978-1-84882-969-5.

BioEcho. 2022. "EchoCLEAN DNA & RNA Cleanup Kits Produkt Brochüre." *Online Verfügbar Unter*. https://doi.org/https://bioecho-prod-media-hp.s3.sbg.perf.cloud.ovh.net/media/d0/9e/c1/1655465490/Cleanup-Brochure_ENG.pd.

Bliss, C. I. 1934. "The Method of Probits." *Science* 79 (2037): 38–39. https://doi.org/10.1126/science.79.2037.38.

Bustin, SA. 2000. "Absolute Quantification of mRNA Using Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assays." *Journal of Molecular Endocrinology* 25 (2): 169–93. https://doi.org/10.1677/jme.0.0250169.

Bustin, Stephen A, Vladimir Benes, Jeremy A Garson, Jan Hellemans, Jim Huggett, Mikael Kubista, Reinhold Mueller, et al. 2009. "The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments." *Clinical Chemistry* 55 (4): 611–22. https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797.

Chander, Yogesh, Jim Koelbl, Jamie Puckett, Michael J. Moser, Audrey J. Klingele, Mark R. Liles, Abel Carrias, David A. Mead, and Thomas W. Schoenfeld. 2014. "A Novel Thermostable Polymerase for RNA and DNA Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)." *Frontiers in Microbiology* 5 (August). https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00395.

Charrel, Rémi N., Xavier de Lamballerie, and Didier Raoult. 2007. "Chikungunya Outbreaks — the Globalization of Vectorborne Diseases." *New England Journal of Medicine* 356 (8): 769–71. https://doi.org/10.1056/nejmp078013.

Chen, Xiaoyong, Shasha Liu, Mohsan Ullah Goraya, Mohamed Maarouf, Shile Huang, and Ji-Long Chen. 2018. "Host Immune Response to Influenza a Virus Infection." *Frontiers in Immunology* 9 (March). https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00320.

Chlanda, Petr, and Joshua Zimmerberg. 2016. "Protein-Lipid Interactions Critical to Replication of the

Influenza a Virus." *FEBS Letters* 590 (13): 1940–54. https://doi.org/10.1002/1873-3468.12118.

Compton, J. 1991. "Nucleic Acid Sequence-Based Amplification." *Nature* 350 (6313): 91–92. https://doi.org/10.1038/350091a0.

Deiman, Birgit, Pierre van Aarle, and Peter Sillekens. 2002. "Characteristics and Applications of Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA)." *Molecular Biotechnology* 20 (2): 163–80. https://doi.org/10.1385/mb:20:2:163.

Dharmapalan, Dhanya. 2020. "Influenza." *The Indian Journal of Pediatrics* 87 (10): 828–32. https://doi.org/10.1007/s12098-020-03214-1.

Diagne, Cheikh Tidiane, Martin Faye, Benjamin Lopez-Jimena, Ahmed Abd El Wahed, Cheikh Loucoubar, Cheikh Fall, Giulia Mencatelli, et al. 2020. "Comparative Analysis of Zika Virus Detection by RT-qPCR, RT-LAMP, and RT-RPA." In *Methods in Molecular Biology*, 165–79. Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0581-3_14.

Firth, Andrew E., and Ian Brierley. 2012. "Non-Canonical Translation in RNA Viruses." *Journal of General Virology* 93 (7): 1385–1409. https://doi.org/10.1099/vir.0.042499-0.

Frey, Andreas, James Di Canzio, and David Zurakowski. 1998. "A Statistically Defined Endpoint Titer Determination Method for Immunoassays." *Journal of Immunological Methods* 221 (1-2): 35–41. https://doi.org/10.1016/s0022-1759(98)00170-7.

Gautam, Akash. 2022. *DNA and RNA Isolation Techniques for Non-Experts*. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-94230-4.

Guatelli, J C, K M Whitfield, D Y Kwoh, K J Barringer, D D Richman, and T R Gingeras. 1990. "Isothermal, in Vitro Amplification of Nucleic Acids by a Multienzyme Reaction Modeled After Retroviral Replication." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87 (5): 1874–78. https://doi.org/10.1073/pnas.87.5.1874.

Higgins, Matthew, Matt Ravenhall, Daniel Ward, Jody Phelan, Amy Ibrahim, Matthew S Forrest, Taane G Clark, and Susana Campino. 2018. "PrimedRPA: Primer Design for Recombinase Polymerase Amplification Assays." Edited by John Hancock. *Bioinformatics* 35 (4): 682–84. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty701.

Huang, Tianzeng, Linzhi Li, Xing Liu, Qi Chen, Xueen Fang, Jilie Kong, Mohamed S. Draz, and Hongmei Cao. 2020. "Loop-Mediated Isothermal Amplification Technique: Principle, Development and Wide Application in Food Safety." *Analytical Methods* 12 (46): 5551–61. https://doi.org/10.1039/d0ay01768j.

Immunization, National Center for, and Respiratory Diseases (U.S.). 2021. "Research Use Only CDC Flu Sc2 Multiplex Assay Primers and Probes." July 2021. https://stacks.cdc.gov/view/cdc/107944.

Iwamoto, Tomotada, Toshiaki Sonobe, and Kozaburo Hayashi. 2003. "Loop-Mediated Isothermal Amplification for Direct Detection of mycobacterium Tuberculosis Complex, m. Avium , and m. Intracellulare in Sputum Samples." *Journal of Clinical Microbiology* 41 (6): 2616–22. https://doi.org/10.1128/jcm.41.6.2616-2622.2003.

Jagger, B. W., H. M. Wise, J. C. Kash, K.-A. Walters, N. M. Wills, Y.-L. Xiao, R. L. Dunfee, et al. 2012. "An Overlapping Protein-Coding Region in Influenza a Virus Segment 3 Modulates the Host Response." *Science* 337 (6091): 199–204. https://doi.org/10.1126/science.1222213.

Johnston, Andrew D., Jennifer Lu, Ke-lin Ru, Darren Korbie, and Matt Trau. 2019. "PrimerROC: Accurate Condition-Independent Dimer Prediction Using ROC Analysis." *Scientific Reports* 9 (1). https://doi.org/10.1038/s41598-018-36612-9.

Jones, Laurie J., Stephen T. Yue, Ching-Ying Cheung, and Victoria L. Singer. 1998. "RNA Quantitation by Fluorescence-Based Solution Assay: RiboGreen Reagent Characterization." *Analytical Biochemistry* 265

(2): 368–74. https://doi.org/10.1006/abio.1998.2914.

Kordyukova, Larisa V., Eleonora V. Shtykova, Lyudmila A. Baratova, Dmitri I. Svergun, and Oleg V. Batishchev. 2018. "Matrix Proteins of Enveloped Viruses: A Case Study of Influenza a Virus M1 Protein." *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 37 (3): 671–90. https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1436089.

Krammer, Florian, Gavin J. D. Smith, Ron A. M. Fouchier, Malik Peiris, Katherine Kedzierska, Peter C. Doherty, Peter Palese, et al. 2018. "Influenza." *Nature Reviews Disease Primers* 4 (1). https://doi.org/10.1038/s41572-018-0002-y.

Louie, Richard F., Tyler Kitano, T. Keith Brock, Robert Derlet, and Gerald J. Kost. 2009. "Point-of-Care Testing for Pandemic Influenza and Biothreats." *Disaster Medicine and Public Health Preparedness* 3 (S2): S193–202. https://doi.org/10.1097/dmp.0b013e3181be6dc4.

Luo, Ming. 2011. "Influenza Virus Entry." In *Viral Molecular Machines*, 201–21. Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0980-9_9.

Malek, Larry, Roy Sooknanan, and Jean Compton. 1994. "Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA™)." In *Protocols for Nucleic Acid Analysis by Nonradioactive Probes*, 253–60. Humana Press. https://doi.org/10.1385/0-89603-254-x:253.

Mann, H. B., and D. R. Whitney. 1947. "On a Test of Whether One of Two Random Variables Is Stochastically Larger Than the Other." *The Annals of Mathematical Statistics* 18 (1): 50–60. https://doi.org/10.1214/aoms/1177730491.

McCauley, J W, and B W J Mahy. 1983. "Structure and Function of the Influenza Virus Genome." *Biochemical Journal* 211 (2): 281–94. https://doi.org/10.1042/bj2110281.

Modrow, Susanne, Dietrich Falke, Uwe Truyen, and Hermann Schätzl. 2010. *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag. https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2241-5.

Mori, Yasuyoshi, Kentaro Nagamine, Norihiro Tomita, and Tsugunori Notomi. 2001. "Detection of Loop-Mediated Isothermal Amplification Reaction by Turbidity Derived from Magnesium Pyrophosphate Formation." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 289 (1): 150–54. https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5921.

Mülhardt, Cornel. 2009. *Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics*. Spektrum Akademischer Verlag. https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2158-6.

Muramoto, Yukiko, Takeshi Noda, Eiryo Kawakami, Ramesh Akkina, and Yoshihiro Kawaoka. 2013. "Identification of Novel Influenza a Virus Proteins Translated from PA mRNA." *Journal of Virology* 87 (5): 2455–62. https://doi.org/10.1128/jvi.02656-12.

Nagamine, K., T. Hase, and T. Notomi. 2002. "Accelerated Reaction by Loop-Mediated Isothermal Amplification Using Loop Primers." *Molecular and Cellular Probes* 16 (3): 223–29. https://doi.org/10.1006/mcpr.2002.0415.

Nayak, Debi P., Rilwan A. Balogun, Hiroshi Yamada, Z. Hong Zhou, and Subrata Barman. 2009. "Influenza Virus Morphogenesis and Budding." *Virus Research* 143 (2): 147–61. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.05.010.

Notomi, T. 2000. "Loop-Mediated Isothermal Amplification of DNA." *Nucleic Acids Research* 28 (12): 63e–63. https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63.

Omran, Qusay Q, Olga Fedorova, Tianshuo Liu, and Anna M Pyle. 2022. "A Molecular Beacon Assay for Monitoring RNA Splicing." *Nucleic Acids Research* 50 (13): e74–74. https://doi.org/10.1093/nar/gkac242.

Pabinger, Stephan, Stefan Rödiger, Albert Kriegner, Klemens Vierlinger, and Andreas Weinhäusel. 2014.

"A Survey of Tools for the Analysis of Quantitative PCR (qPCR) Data." *Biomolecular Detection and Quantification* 1 (1): 23–33. https://doi.org/10.1016/j.bdq.2014.08.002.

Parida, Manmohan, Santhosh Sannarangaiah, Paban Kumar Dash, P. V. L. Rao, and Kouichi Morita. 2008. "Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP): A New Generation of Innovative Gene Amplification Technique; Perspectives in Clinical Diagnosis of Infectious Diseases." *Reviews in Medical Virology* 18 (6): 407–21. https://doi.org/10.1002/rmv.593.

Park, Jee-Woong. 2022. "Principles and Applications of Loop-Mediated Isothermal Amplification to Point-of-Care Tests." *Biosensors* 12 (10): 857. https://doi.org/10.3390/bios12100857.

Prazeres, Duarte Miguel F, Thomas Schluep, and Charles Cooney. 1998. "Preparative Purification of Supercoiled Plasmid DNA Using Anion-Exchange Chromatography." *Journal of Chromatography A* 806 (1): 31–45. https://doi.org/10.1016/s0021-9673(97)01254-5.

QIAGEN. 2021. "QIAGEN® PlasmidPurification Handbook." *QIAGEN Plasmid Mini, Midi, Maxi, Mega, andGiga Kits. For Purification of Ultrapure, Transfection-Grade Plasmid DNA Online Verfügbar Unter: Https://Www.qiagen.com/Us/Resources/Download.aspx?id=0bd0c5fb-C271-43e7-Af43-32d539374fa9&lang=en.*

Ritz, C., and A.-N. Spiess. 2008. "qpcR: An r Package for Sigmoidal Model Selection in Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Analysis." *Bioinformatics* 24 (13): 1549–51. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn227.

Rödiger, Stefan, Michał Burdukiewicz, and Peter Schierack. 2015. "chipPCR: An r Package to Pre-Process Raw Data of Amplification Curves: Fig. 1." *Bioinformatics* 31 (17): 2900–2902. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv205.

Rödiger, Stefan, Michal Burdukiewicz, Andrej-Nikolai Spiess, and Konstantin Blagodatskikh. 2022. "PCRedux204 Package - an Overview [Vignette]." *Comprehensive R Archive Network, 1–104.* https: 205 //cran.r-project.org/web/packages/PCRedux/vignettes/PCRedux.pdf.

Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. "DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74 (12): 5463–67. https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463.

Sanjuán, Rafael, and Pilar Domingo-Calap. 2016. "Mechanisms of Viral Mutation." *Cellular and Molecular Life Sciences* 73 (23): 4433–48. https://doi.org/10.1007/s00018-016-2299-6.

Schmidt, Torsten, Karl Friehs, Martin Schleef, Carsten Voss, and Erwin Flaschel. 1999. "Quantitative Analysis of Plasmid Forms by Agarose and Capillary Gel Electrophoresis." *Analytical Biochemistry* 274 (2): 235–40. https://doi.org/10.1006/abio.1999.4291.

Selman, Mohammed, Samar K Dankar, Nicole E Forbes, Jian-Jun Jia, and Earl G Brown. 2012. "Adaptive Mutation in Influenza a Virus Non-Structural Gene Is Linked to Host Switching and Induces a Novel Protein by Alternative Splicing." *Emerging Microbes &Amp; Infections* 1 (1): 1–10. https://doi.org/10.1038/emi.2012.38.

SHAPIRO, S. S., and M. B. WILK. 1965. "An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples)." *Biometrika* 52 (3-4): 591–611. https://doi.org/10.1093/biomet/52.3-4.591.

Sievers, Fabian, and Desmond G. Higgins. 2017. "Clustal Omega for Making Accurate Alignments of Many Protein Sequences." *Protein Science* 27 (1): 135–45. https://doi.org/10.1002/pro.3290.

Silva, Severino Jefferson Ribeiro da, Keith Pardee, and Lindomar Pena. 2019. "Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for the Diagnosis of Zika Virus: A Review." *Viruses* 12 (1): 19. https://doi.org/10.3390/v12010019.

Smith, Duncan R. n.d. "Restriction Endonuclease Digestion of DNA." In *Transgenesis Techniques*, 427–32. Humana Press. https://doi.org/10.1385/0-89603-245-0:427.

Soroka, Marianna, Barbara Wasowicz, and Anna Rymaszewska. 2021. "Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): The Better Sibling of PCR?" *Cells* 10 (8): 1931. https://doi.org/10.3390/cells10081931.

To, Janet, and Jaume Torres. 2019. "Viroporins in the Influenza Virus." *Cells* 8 (7): 654. https://doi.org/10.3390/cells8070654.

Tomita, Norihiro, Yasuyoshi Mori, Hidetoshi Kanda, and Tsugunori Notomi. 2008. "Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) of Gene Sequences and Simple Visual Detection of Products." *Nature Protocols* 3 (5): 877–82. https://doi.org/10.1038/nprot.2008.57.

Valera, Enrique, Aaron Jankelow, Jongwon Lim, Victoria Kindratenko, Anurup Ganguli, Karen White, James Kumar, and Rashid Bashir. 2021. "COVID-19 Point-of-Care Diagnostics: Present and Future." *ACS Nano* 15 (5): 7899–7906. https://doi.org/10.1021/acsnano.1c02981.

Vasin, A. V., O. A. Temkina, V. V. Egorov, S. A. Klotchenko, M. A. Plotnikova, and O. I. Kiselev. 2014. "Molecular Mechanisms Enhancing the Proteome of Influenza a Viruses: An Overview of Recently Discovered Proteins." *Virus Research* 185 (June): 53–63. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.03.015.

Velthuis, Aartjan J. W. te, and Ervin Fodor. 2016. "Influenza Virus RNA Polymerase: Insights into the Mechanisms of Viral RNA Synthesis." *Nature Reviews Microbiology* 14 (8): 479–93. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.87.

Wise, Helen M., Edward C. Hutchinson, Brett W. Jagger, Amanda D. Stuart, Zi H. Kang, Nicole Robb, Louis M. Schwartzman, et al. 2012. "Identification of a Novel Splice Variant Form of the Influenza a Virus M2 Ion Channel with an Antigenically Distinct Ectodomain." Edited by Andrew Pekosz. *PLoS Pathogens* 8 (11): e1002998. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002998.

Zhang, Wei S., Jianbin Pan, Feng Li, Min Zhu, Mengting Xu, Hongyan Zhu, Yanyan Yu, and Gaoxing Su. 2021. "Reverse Transcription Recombinase Polymerase Amplification Coupled with CRISPR-Cas12a for Facile and Highly Sensitive Colorimetric SARS-CoV-2 Detection." *Analytical Chemistry* 93 (8): 4126–33. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c00013.