

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>2</b>
1.1	Influenza B . . . . .	2
1.1.1	Herstellung der Influenza B Virus Standard-RNA . . . . .	2
1.1.2	Entwicklung der InfB-RPA Primer . . . . .	3
1.1.3	Optimierung der InfB RPA . . . . .	4
1.2	Influenza A . . . . .	5
1.2.1	Herstellung der Influenza A Virus Standard-RNA . . . . .	5
1.2.2	Entwicklung der InfB-RPA Primer . . . . .	7
1.2.3	Optimierung der Infb-RPA . . . . .	7
1.2.4	Primerassymetrie . . . . .	7
1.2.5	Sensitisanalysen und Vergleich . . . . .	7
1.2.6	Spezifität . . . . .	7
1.3	Influenza A . . . . .	7
1.3.1	Entwicklung der InfA-RPA Primer . . . . .	7
1.3.2	Optimierung der InfbARPA . . . . .	7
1.3.3	Sensitivitätsanalysen und Vergleich . . . . .	7
1.3.4	Einfluss von Sondendesign auf die InfA-RPA . . . . .	8
1.3.5	Spezifitätstest . . . . .	8

# 1 Ergebnisse

## 1.1 Influenza B

### 1.1.1 Herstellung der Influenza B Virus Standard-RNA

Für den Vergleich zwischen der RT-PCR und der RT-RPA sowie der variierenden Parameter ist es nötig, standardisierte Virus-RNA mit einer definierten Konzentration herzustellen. Dabei diente ein artifizielles DNA-Plasmid mit der inserierten Virus-Sequenz als Ausgangsmaterial. Dieses wurde in *E. coli* transformiert, durch Kultivierung vermehrt und anschließend mittels verschiedener Methoden zur Virus-RNA transkribiert.

zum Beginn der Arbeit war bereits ein mit dem Influenza B Plasmid (Plasmidkarte siehe Anhang ??) transformierter *e. coli* Stamm vorhanden. Dieser wurde kultiviert und anschließend das Influenza B Plasmid extrahiert (Kapitel ??). Durch eine anschließende Sanger-Sequenzierung (Kapitel ??) der Influenza B Virussequenz auf dem extrahierten DNA-Plasmid konnten Sequenzfehler ausgeschlossen werden und die korrekte Virus-Sequenz bestätigt werden. In Vorbereitung für die *in Vitro* Transkription wurde das Plasmid durch einen Restriktion-verdau linearisiert und über ein Agarose-Gel überprüft (Kapitel ??). Das Kontrollgel (siehe Abbildung 1A) weist zwei unterschiedlich große DNA-Banden auf. Das linearisierte Plasmid in Spur 2 zeigt wie erwartet eine Bande bei ~3400 bp und das unverdaute Kontrollplasmid in Spur 3 eine Bande bei weit über 4000 bp. Daraus lässt sich schließen, dass die Linearisierung durch den Restriktionsverdau erfolgreich war. Das linearisierte Plasmid wurde von Puffer und Enzymrückständen befreit (Kapitel ??) und über eine *in vitro* Transkription mithilfe des auf dem Plasmid befindlichen T7-Promotors (Kapitel ??) in RNA überführt. Die synthetisierte virale RNA wurde im letzten Schritt mit dem RiboGreen Assay (Kapitel ??) quantifiziert. Die Kalibriergerade des RiboGreen Assays ist in Abbildung 1B gezeigt. Es ergab sich eine Geradengleichung von  $y = 22 + 3,6x$  mit einem Korrelationskoeffizient  $R$  von 0,99. Mithilfe der Geradengleichung konnte für die synthetisierte RNA eine Konzentration von  $476.0 \pm 7,8$  ng/ml und somit eine Kopienanzahl von  $2,2 \cdot 10^8$  RNA-Kopien/ $\mu$ l berechnet werden.

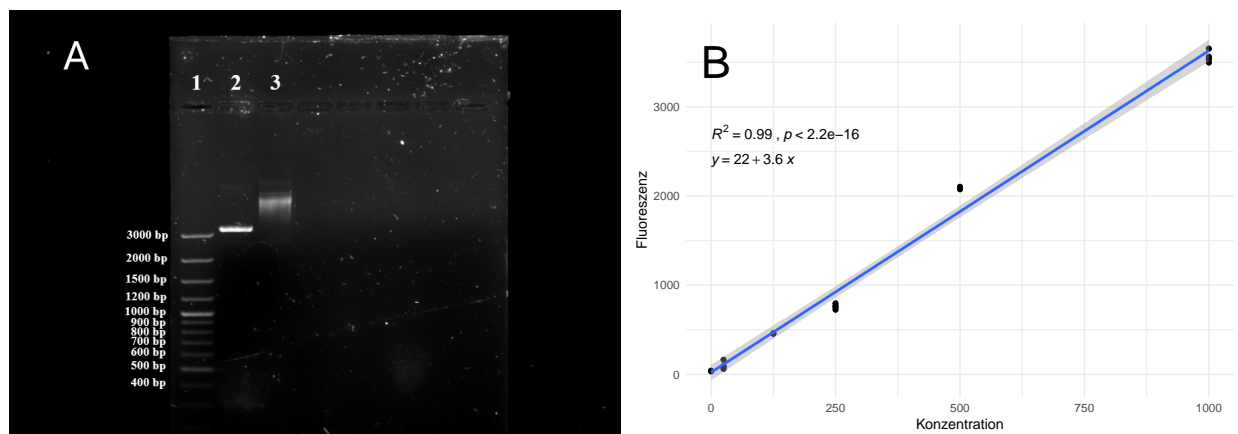


Abbildung 1: **Kontrollgel und Ribogreen Kalibrationsgerade der Influenza B Standardherstellung:** **A:** DNA-Banden des Kontrollgels für den Restriktionsverdau des Influenza B Plasmids mit verdaulichem Plasmid (2), unverdaulichem Kontrollplasmid (3) und mitgeführter DNA-Leiter (1). Das linearisierte Plasmid läuft bei ca. 3400 bp und somit unter dem mitgeführten ungeschnittenen Kontrollplasmid. 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.

### 1.1.2 Entwicklung der InfB-RPA Primer

Für die Influenza B RT-RPA wurden mithilfe der Software PrimedRPA insgesamt 9 verschiedene Primer und 2 Sonden gefunden. Die Sequenzen sind in Tabelle 1 mit entsprechenden Modifikationen und 3'-Position auf der Virus-Sequenz gezeigt. Daraus ergeben sich insgesamt 10 Primer-Sonden-Kombinationen. Davon bestehen 2 Kombinationen aus Sonde 1.1 mit Forward1 und Reverse 1.1 und Reverse 1.2. Die restlichen 8 Kombinationen setzten sich aus Sonde 3.1, Forward 1 oder Forward 2 und Reverse 3.3 - 3.15 zusammen.

Tabelle 1: Entwickelte Primer und Sonden für die Influenza B RT-RPA

Name	Sequenz (5'→3')	3'-Position	Modifikation
Sonde 3.1	GTTCCGTTTGACAATAAAAAGGGATATGCG 12 A 3 TGTATTGTCCYTGAGAG	559 bp	Fluorophor: FAM Quencher: BMQ-535**
Sonde 1.1	GCTAAACTTGTGCTACTGATGATCTTACAG 12 G 3 AGGATGAAGAAGATGG	707 bp	Fluorophor: FAM Quencher: BMQ-535**
forward 1	TTGAATGCATATGACCAGAGTGGAAGGCTT	654 bp	/
forward 3	GGAGGAAGTAAACACTCAGAAAGAAGGGAA	509 bp	/
forward 4	GAGACATGAACAACAGAGATGCAAGGCAAA	472 bp	/
reverse 1.1	CCTTCATTAAGACGCTCGAAGAGTGARTTG	720 bp	/
reverse 1.2	TGAATGTCCTTCATTAAGACGCTCGAAGAG	727 bp	/
reverse 3.3	ATTGGGGTGTTTGAGGAATGTTCCGTTTAC	565 bp	/
reverse 3.6	ATCCATTGGGGTGTTTGAGGAATGTTCCGT	569 bp	/
reverse 3.10	CTGTATCCATTGGGGTGTTTGAGGAATGT	574 bp	/
reverse 3.15	AGTTGATAAGGACTTGTATCCATTGGGGTG	586 bp	/

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

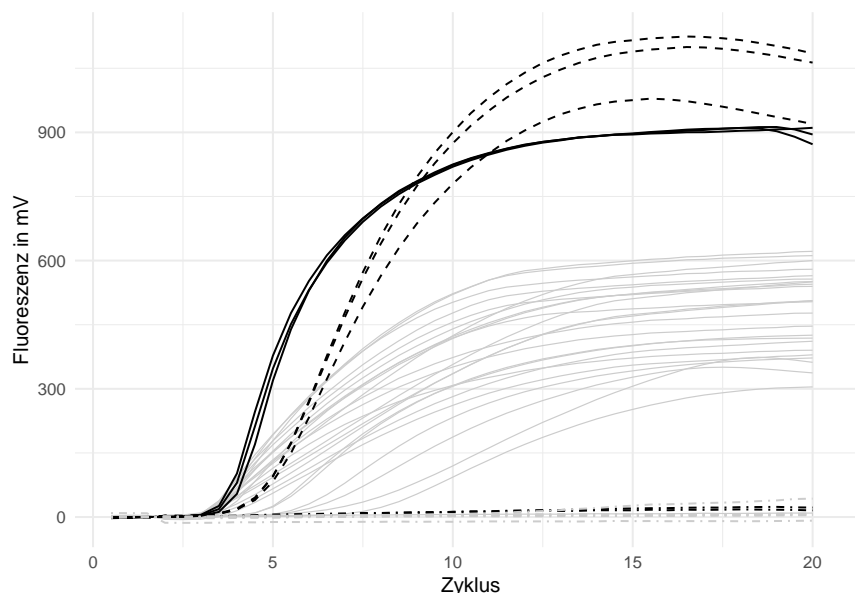


Abbildung 2: **Etablierung der Influenza B RPA im Original- und 8tel-Ansatz:** Normalisierte Fluoreszenzdaten der 50µl RPA (n=3) und der 8tel RPA (n=6). Messung bei 40 °C ohne Unterbrechung durch einen Mischschritt. Messung mit jeweils 10<sup>6</sup> Virus-RNA-Molekülen/µl als Ausgangsmaterial

Die entwickelten Primer-Sonden-Kombinationen wurden in einem Screening Verfahren mittels RT-RPA in einer Dreifachbestimmung auf Amplifikation getestet (Kapitel ??). Die Fluoreszenzdaten sind in Abbildung 2 gezeigt. Die Kombinationen mit Sonde 1.1 (schwarz) zeichnen sich durch einen steileren Anstieg und höhere Fluoreszenzwerte im Vergleich zu den Kombinationen mit Sonde 3.1 (grau) aus. Des Weiteren lässt sich bei

der Kombination mit Reverse 1.1 (schwarz, durchgängig) ein signifikant niedrigerer Anstieg als bei der Kombination mit Reverse 1.2 (schwarz, gestrichelt) beobachten. Die Mittelwerte der TT-Werte für die jeweiligen Kombinationen liegen bei  $3,33 \pm 0,07$  (Reverse 1.1) und  $4,27 \pm 0,07$  (Reverse 1.2). Die Kombination mit Reverse 1.2 erreicht im Verlauf höhere Fluoreszenzintensitäten, jedoch deutet ein zeitigerer Anstieg, sprich niedrigere TT-Werte, auf eine schnellere Amplifikation. Aus diesem Grund wurde die Kombination mit Reverse 1.1 zusammen mit Forward 1 und Sonde 1.1 (schwarz, durchgezogen) als bestmöglich eingestuft und für alle nachfolgenden Versuche **Ergebnisse** in diesem Kapitel verwendet.

### **1.1.3 Optimierung der InfB RPA**

#### **Verringerung des Reaktionsvolumen (8tel Ansatz)**

## 1.2 Influenza A

### 1.2.1 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 aktuell 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 ??) in *E. coli* transformiert. Anschließend wurden die transformierten Bakterien, wie in Kapitel ?? angegeben kultiviert und die Plasmid-DNA isoliert. Durch eine anschließende Sequenzierung 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 ?? angegeben durchgeführt. Die zur Überprüfung der erfolgreichen Linearisierung durchgeführten Agarose-Gele sind in Abbildung 3 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 ?? beschriebenen Methode von Enzym- und Pufferrückständen entfernt. Die gereinigte DNA wurde im nächsten Schritt mithilfe der in Kapitel ?? angegebenen 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 quantifiziert (siehe Methode unter Kapitel ??). Dabei wurden jeweils die RNA-Standards H3N2 (2005) und H1N1 (2020) innerhalb einer Messung und die Standards H1N1 (2004) und H3N2 (2020) in einem separaten 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 angegebenen 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 ?? angegeben.

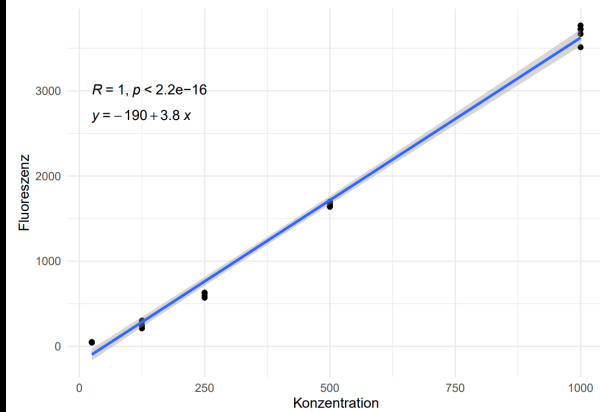
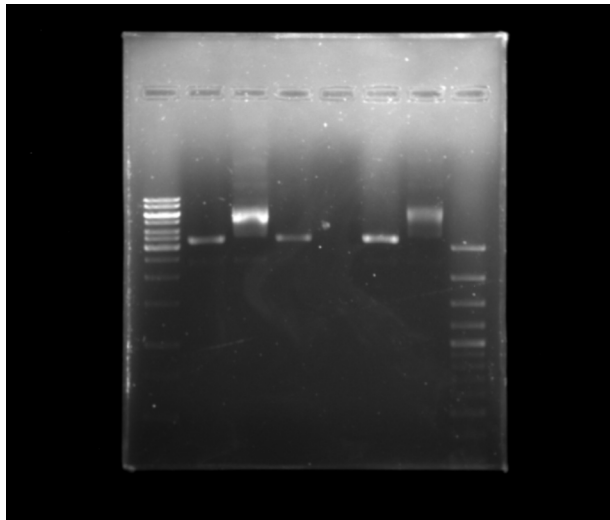


Abbildung 3: **Kontrollgel des Restriktionsverdaus und Ribogreen Kalibrationsgeraden der Influenza A Plasmide:** **A:** DNA-Banden des Kontrollgels für den Restriktionsverdaus der Influenza A Plasmide. DNA-Banden des verdautes Plasmid des 2005 H3N2 Standards (2) mit unverdaute Kontrolle (3), verdautes Plasmid des aktuellem H1N1 Standards (4) mit unverdaute Kontrolle (5) sowie verdautes Plasmid des aktuellem H3N2 Standard (6) mit unverdautes Kontrollplasmid (7), sowie mitgeführte 100 bp plus DNA-Leiter (8) und 1000 bp DNA-Leiter (1). DNA-Banden des verdautes Plasmid des 2004 H1N1 Standards (2) mit unverdautes 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.

### **1.2.2 Entwicklung der InfB-RPA Primer**

- Tabelle mit allen getesteten Primern und Sonden + auf die Primer und sonden in Methoden verweisen?
  - oder die Sonden aus dem Methoden teil mir rein zu nehmen und da raus nehmen
- Graphen der Tests (grau und die guten farbig)
- Sensitivität ohne optimierungsparameter? müsste ich noch machen
  - wenn sensitivität dann auch Spezifität

### **1.2.3 Optimierung der InfB-RPA**

- 8tel Ansatz
- Temperatur
- Mischzeitpunkt

### **1.2.4 Primerassymetrie**

- soll ich hier dann noch das Experiment zum bestätigen der Assymetrie mit rein nehmen? oder extra Punkt

### **1.2.5 Sensitisanalysen und Verlgleich**

- Sensitivität mit allen Optimirungsparametern 8tel Ansatz gegenüberstellen
  - weil literatur sagt, dass dadurch eine Erhöhung der Sensitivität erhalten werden kann
- Sensitivität PCR und RPA gegenüberstellen

### **1.2.6 Spezifität**

- Spezifität

## **1.3 Influenza A**

### **1.3.1 Entwicklung der InfA-RPA Primer**

- Tabelle mit allen getesteten Primern und Sonden + auf die Primer und sonden in Methoden verweisen?
  - oder die Sonden aus dem Methoden teil mir rein zu nehmen und da raus nehmen
- Graphen der Tests (grau und die guten farbig)
- Sensitivität ohne optimierungsparameter? müsste ich noch machen
  - wenn sensitivität dann auch Spezifität

### **1.3.2 Optimierung der InfBARPA**

- 8tel Ansatz
- Temperatur
- Mischzeitpunkt
- Primerassymetrie

### **1.3.3 Sensitivitätsanalysen und Vergleich**

- Sensitivitätstest und vergleich mit PCR

#### **1.3.4 Einfluss von Sondendesign auf die InfA-RPA**

- Test mit neuer Sonde
- Sensitivitätsvergleich

#### **1.3.5 Spezifitätstest**