

3 Material

3.1 Bakterien

E. coli TOP10F' (Invitrogen): F'(lacIqTeeR), mcrA, Δ (mrr-hsdRMS-, mcrBC), Φ 80lacZ Δ M15, Δ lacX74deoR, recA1, araD139, Δ (ara-leu)7697, galU, galK, rpsL, endA1, nupG

E. coli DH5 Δ (Vieira und Messing, 1982): F⁻, f Δ 80lacZ Δ M15, endA1, recA1, hsdR17 (rK⁻ mK⁺), supE44, thi-1, d⁻, gyrA96, Δ (lacZYA-argF), U169

3.2 Vektoren

pcDNA3.1 (+) (Invitrogen): f1 ori, ColE1 ori, pSV40 ori, Enhancer-Promotor-Sequenz des human Cytomegalovirus (CMV), Polyadenylierungssignal und Transkriptions-Terminations-Sequenzen des Rinderwachstumshormons (BGH), multiple Klonierungsstellen mit flankierenden T7-BGH-Promotoren, Ampicillin- und Neomycin-Resistenz, Größe: 5,4 kb.

pZeoSV2(+) (Invitrogen): f1 ori, ColE1 ori, pomp, poem, pSV40, Polyadenylierungssignal und Transkriptions-Terminations-Sequenzen des Rinderwachstumshormons (BGH), multiple Klonierungsstellen mit flankierenden T7-BGH Promotoren, Zeocin-Resistenz, Größe: 3,5 kb.

3.3 Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden der Stammsammlung der Arbeitsgruppe entnommen:

| | | |
|-------------|--|-----------------------|
| CHO-K1 | Hamsterovarien-Zelllinie | ATCC.CCL-61 |
| MDA-MB435 | humane Brust-Karzinomzellen | ATCC.HTB129 |
| MDA-MB435S1 | Subklon von MDA-MB435 aus dem Labor von Dr.W. Birchmeier (Frixen et al., 1991) | |
| HEK293 | Adenovirus 5-transformierte embryonale Nierenzelllinie humanen Ursprungs | ATCC.CRL1573 |
| HUT78 | humane lymphoblastoide T-Zelllinie | ECACC.88041901 |
| Jurkat | humane Leukämie T-Zelllinie | ATCC.TIB-152 |
| CCRF-CEM | humane lymphoblastoide T-Zelllinie | ATCC.CRL -119 |
| CMLT-1 | humane Leukämie T-Zelllinie | ATCC.ACC 7 |
| ESIII | Burkitt-Lymphom-Linie t(8;14), EBV- | (Ganser et al., 1988) |
| Raji | Burkitt-Lymphom-Linie t(8;14), EBV+ | ATCC.CCL 86 |
| Namalwa | Burkitt-Lymphom-Linie, EBV+ | ATCC.CRL 1432 |

| | | |
|--|--------------------------|------------------------|
| BL64 | Burkitt-Lymphom-Linie | (Hartl und Lipp, 1987) |
| U373 | Glioblastoma-Astrocytoma | ATCC.HTB 17 |
| Hybridom-Klon D171, 9E10, 3D12, 8B2, 1D9 | | |

3.4 Mäuse

CXCR5^{-/-}-Mäuse (SV129/EV) und CCR7^{-/-}- und wt-Mäuse mit gemischten genetischen Hintergrund von SV129/EV und BALB/c stammen aus der Zucht der AG Dr. Lipp am MDC, BALB/c- und SV129/EV-Mäuse wurden von der Charles River Deutschland GmbH (Sulzfeld) bezogen. Nacktmäuse, d.h. athymische *nude* Mäuse (NMRI-nu), wurden im Tierstall der AG Frau Dr. Fichtner (MDC) gehalten.

3.5 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden aus dem Labor von BioTeZ (Berlin) bezogen.

Oligonukleotide für die Klonierung der Chemokine und Chemokinrezeptoren

| | |
|-------------------|---|
| HumanCXCL8-5: | AGC AGG ATC CAT GAC TTC CAA GCT GG |
| HumanCXCL8-3: | GTG CCT CGA GTT TTA TGA ATT CTC AGC |
| HumanCCL19-5: | AGC GGA TCC GTT CAC CCT CCA TGG CCC TGC TA |
| HumanCCL19-3: | ATG GAA TTC CGG TCA TAG GTT AAC TGC TGC |
| HuCCL19GST-5: | CGG GAT CCT GAG TGG CAC CAA TGA TGC TG |
| HuCCL19GST-3: | GGA ATT CTT AAC TGC TGC GGC GCT TCA TCT TGG CTG AGGTC |
| murinCCL19-5: | GCA GGA TCC CCT CAG ATT ATC TGC CAT GGC CCC |
| murinCCL19-3: | TGC GAA TTC CTT TAC TCA AGA CAC AGG GCT CC |
| HuCCL19-Genom-5: | AGC GGA TCC GTT CAC CCT CCA TGG CCC TGC TA |
| HuCCL19-Genom-3: | ATG GAA TTC CGG TCA TAG GTT AAC TGC TGC G |
| HuCCL19-Spleiß-5: | ACT GGA TCC GGC CTG CCT CTG TTC ACC CTC C |
| HuCCL19-Spleiß-3: | ACT GAA TTC CGG GCT CCC TCT GCA CGG TCA TAG G |
| HuCCL21-Genom-5: | ACA GGA TCC AGA CAT GGC TCA GTC ACT GG |
| HuCCL21-Genom-3: | ATG GGA TTC ACT GGG CTA TGG CCC TTT AGG |
| HumanCCL21-5: | ACA GGA TCC GGC ACG AGG CAG ACA TGG CT |
| HumanCCL21-3: | ATG GAA TTC GGC TCC AGG CTG CTC ACT GGG |
| HumanCXCL13-5: | GCG GAT CCA TGA AGT TCA TCT CGA CAT CTC |
| HumanCXCL13-3: | GCG CTC GAG TCA GCA TCA GGG AAT CTT TCT C |
| HuCCR7-5: | GGT CCC CCT GCT GGC CAT GAG C |
| HuCCR7-3: | CTC GAA TTC CTA TGG GGA GAA GGT GGT GGT GG |

Oligonukleotide für die Analyse der Chemokin-Expression:

| | |
|-------------|-------------------------------------|
| HuCCL19-5: | ACT TCC CCA GCC CCA ACT CTG AGT GGC |
| HuCCL19-3: | ATG GAA TTC CGG TCA TAG GTT AAC TGC |
| HuCCL21-5: | ATC CCC AGG ACC CAA GGC AGT GAT GGA |
| HuCCL21-3: | CTA TGG CCC TTT AGG GGT CT |
| HuCXCL13-5: | CCA GTC CAA GGT GTT CTG G |
| HuCXCL13-3: | AGT GGA AAT ATC AGC ATC AGG GAA TCT |
| HuCXCL12-5: | ATG AAC GCC AAG GTC GTG G |
| HuCXCL12-3: | TCA CAT CTT GAA CCT CTT G |
| HuCCL17-5: | ATG GCC CCA CTG AAG ATG C |
| HuCCL17-3: | TCA AGG CTT TGC AGG TAT TTA ACT GC |
| HuCCL22-5: | ATG GAT CGC CTA CAG AC |
| HuCCL22-3: | TCA GCT TAT TGA GAA TC |

3.6 Enzyme

Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, D:

Taq-DNA-Polymerase, Restriktionsenzyme, ^{T7}Sequencing-Kit, Thermo Sequenase cycle sequencing kit

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, D:

Alkalische Phosphatase; Klenow-Polymerase; RNase A; T4-DNA-Ligase; Restriktionsenzyme

Gibco BRL Life Technologies:

Random Primers DNA Labeling System, SuperScript, Reverse Transkriptase, RNase H

InViTek, Berlin, D:

CombiPol DNA Polymerase Mix

MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot:

Restriktionsenzyme

New England Biolabs, Schwalbach, D:

Alkalische Phosphatase; Klenow-Polymerase; T4 DNA-Kinase; T4 DNA-Ligase; T4 DNA-Polymerase; Restriktionsenzyme; Vent-DNA-Polymerase

Promega Biotec, Madison, Wis., USA:

T4 DNA-Ligase

Stratagene, San Diego, Calif., USA:

Taq-DNA-Polymerase; Restriktionsenzyme

Pierce, Rockford

ImmunoPure F(ab')₂ Preparation Kit

3.7 Antikörper und Konjugate

Antikörper in der AG Dr. M. Lipp am MDC und Dr. Kremmer, GSF-München hergestellt gegen die Chemokinrezeptoren:

- Antikörper 3D12 gegen humanes CCR7 (IgG2a), Antikörper 8B2 gegen humanes CXCR5 (IgG2b), Antikörper mB1 gegen murines CXCR5 und Antikörper 1D9 und 2B11 gegen murines/humanes CXCR4 (IgG2b).

gegen Poliovirusrezeptor CD155:

- Antikörper D171 (IgG1)

Amersham, USA:

anti-Maus-POD; anti-Ratte-POD

Becton Dickinson, USA:

anti-human CD3-PE (IgG2a); IgG2a-PE

Caltag Laboratories:

Ratte anti-murin CD62L

Calbiochem:

Maus anti-human Vimentin (IgG1)

Chemikon, Temecula, Calif., USA:

Mix aus Antikörpern für Kollagen-bindende Integrine: anti-Integrin $\alpha 1-6$, und ν ; anti-Integrin $\beta 1$ Untereinheit; anti-Integrin $\beta 2$ Untereinheit; anti-Integrin $\alpha \nu \beta 3$

Dako, Dänemark:

Maus anti-HLA ABC (IgG2a)

Immunotech, Frankreich:

Maus IgG1-FITC/PE

Pharmingen, Deutschland:

Streptavidin-Cychrome; anti-murin CD3 ϵ -PE/-FITC/Cy5; anti-murin B220-FITC; anti-murin CD4-FITC/PE; anti-murin CD8-FITC/PE; anti-murin CD62L-FITC; anti-murin CD45RB-PE, anti-murin CD44-PE; Ratte IgG2a und IgG2b; anti-human CD54-PE

Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Groove, PA, USA:

Streptavidin-FITC; Streptavidin-PE; Maus-anti-Ratte-FITC; Maus-anti-Ratte-Biotin; Ratte-anti-Maus-FITC; Maus-anti-Ziege-Biotin

R&D Systems

Ziege anti-murin *CCL19* und *CCL21*, Ziege anti-human *CCL19* und *CCL21* in PBS gelöst; Ziege anti-human und murin CXCL13, Maus anti-human CXCR3-PE (IgG1)

Santa Cruz Biotechnology:

Ziege IgG

Sigma Chemie, Deutschland:

anti-human CD4-PE; anti-human CD19-FITC; anti-human CD19-PE; anti-human CD19-Cychrome; Phalloidin-FITC

3.8 Chemikalien, Geräte und sonstige Materialien

Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg:

[α -³⁵S]-thio-dATP (800 Ci/mmol), 2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); Ficoll 400

Bachofer, Reutlingen:

PCR-Prozessor (Thermocycler 60); Vacuum Concentrator; UV-Bank (Fluo-Link)

Bayer AG, Pharma Deutschland:

Ciprobay100

Beckman Instruments GmbH, Klosterneuburg:

Zentrifugen: Optima TLX, GS-6KR, J2-MI

Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg:

Durchflußzytometer FACScan; Zellsortierer FACS-Vantage; FACSTFlow, Maus Kollagen Typ IV

Berthold GmbH, Bad Wildbach:

Luminometer Lumat 9507

Biochrom KG, Berlin:

DMEM; Ficoll-Separating-Solution; FKS; PBS-d; Trypsin

Biometra GmbH, Göttingen:

Trio-Thermoblock

BioRad GmbH, München:

Gene-Pulser; Power Supply 200/2.0

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim:

Adenosin-5'-triphosphat (ATP); Agarose MP; Albumin Fraktion V (BSA); Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG); Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)

Calbiochem GmbH, Frankfurt/Main:

Dithiothreitol (DTT); FURA 2/AM; Anisomycin; Genistein; PD 98059; Wortmannin; Chelerythrin Chlorid; Ly294002, BAPTA/AM, Bis I (Bisindolylmaleimid)

Costar GmbH, Bodenheim:

Transwell-Zellkulturplatteneinsätze; Nucleopore-Polykarbonatmembranen

Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA:

Bacto-Agar; Bacto-Trypton; Casaminsäuren; Hefe-Extract

Eppendorf Gerätebau, Hamburg:

Tischzentrifuge 5415; Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml und 2,2 ml

Fluka Feinchemikalien, Neu-Ulm:

Chloroform; Formamid

Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein:

DMEM-Medium; FKS; G418; Glutamin; 2-Mercaptoethanol (für Zellkultur); Penizillin-Streptomycin; RPMI-Medium, Ultrosor G

Greiner GmbH, Nürtingen:

FACS-Röhrchen; Zellkulturflaschen; Plastik-Reagenzröhrchen 10 ml und 50 ml

Hereaus Instruments GmbH, Hanau:

Brutschränke; Zentrifugen:

Biofuge 13, 15 und 28RS; Minifuge RF; Varifuge 3, 2RS und 20RS

Hybaid, Teddington, Großbritannien:

Gelelektrophoresekammern

ICN:

Phosphorus-32, 185 mBq

IEC, Needham Hights, MA, USA:

MicroMax Zentrifuge

LI-COR, Lincoln, Nebr., USA:

Automatischer Sequenzierer, Modell 4000

Membrapure, Bodenheim:

Sterilfiltrations-Systeme

E. Merck AG, Darmstadt:

Ammoniak; Ammoniumperoxodisulfat; Ampicillin; Borsäure; Bromphenolblau; Chloroform; Dikaliumhydrogenphosphat; Dimethylformamid (DMF); Dimethylsulfoxid (DMSO); Dinatriumhydrogenphosphat; Essigsäure; Ethanol; Ethidiumbromid; Ethylen-diamintetraessigsäure (EDTA); EGTA; Formaldehyd; Formamid; Glukose; Guanidiniumthiocyanat; HEPES; Isoamylalkohol; Isopropanol; Kaliumacetat; Kaliumchlorid; Kaliumdihydrogenphosphat; Kaliumhydroxid; Kalziumchlorid; Kristallviolett; Lithiumchlorid; Magnesiumacetat; Magnesiumchlorid; Magnesiumsulfat; Natriumacetat; Natriumchlorid; Natriumcitrat; Natriumdihydrogenphosphat; Natriumdodecylsulfat (SDS); Natriumhydrogencarbonat; Paraffinöl; Phenol; Polyethylenglykol 6000; Salzsäure; Saccharose; Tetramethyldiamin (TEMED); Triton X-100; Xylencyanol

MBI-Fermentas:

pUC-Mix

Milipore, Eschborn:

Nylonnetz

NEN Life Science Products, Boston, USA:

TSA Verstärkungssystem

Neuro Probe Inc., Cabin John, Md., USA:

Chemotaxis-Kammer

Nunc-GmbH, Wiesbaden:

Cryotubes 2 ml; Impfnadeln und Impfösen; 96-Loch-Mikrotiterplatten; Plastikpetrischalen; Zellkulturflaschen; Zellkulturschalen

Promega, Madison, Wis., USA:

Dual Luziferase Reporter Assay System

Qiagen GmbH, Düsseldorf:

Qiagen Plasmid Kits

R&D Systems GmbH, Wiesbaden:

Murines *CCL19* und *CCL21*, humanes *CCL19* und *CCL21*, und humanes CXCL12 in PBS gelöst

Recker, Berlin:

50 ml Röhrchen; Zellkultur-Schalen und -Flaschen

Roth, Karlsruhe:

Agar-Agar; Aceton; Borsäure, Diethylether; Dithiothreitol (DTT); Ethanol; Glycerin; Hefe-Extrakt; HEPES; Isopropanol; Kaliumacetat; Kaliumcarbonat; Methanol; 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS); Natriumcitrat; Natriumlaurylsulfat (SDS); Paraformaldehyd; Pepton aus Fleisch; Pepton aus Casein (Trypton); Phenol; Polyethylenglykol 6000

Sartorius GmbH, Göttingen:

Minisart NML Sterilfilter 0,2 und 0,45 μm Porengröße

Serva, Heidelberg:

Acrylamid; Gelatine; Glaswatte (silanisiert); Harnstoff; N,N'-Methylbisacrylamid; Polyvinylpyrrolidon (PVP); Silikonlösung;

Shimadzu Europe GmbH, Duisburg:

Fluoreszenzspektrophotometer RS 1502

Sigma Chemie, München:

Ampicillin; Ethidiumbromid; 2-Mercaptoethanol; 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS); Tunicamycin, Phalloidin-FITC

Spectrum Laboratories INC, USA:

Float-A-Lyser

Stratagene GmbH, Heidelberg:

PathDetect Elk1 trans -Reporting System

Whatman Limited, Springfield Mill, Maidstone, Ky., USA:

3 MM-Papier