

4 Methoden

4.1 Kultivierung von prokaryotischen Zellen

LB-Medium	1 % Trypton 0,5 % Hefe-Extrakt 0,5 % NaCl	TYM-Medium	2 % Trypton 0,5 % Hefe-Extrakt 0,1 M NaCl 10 mM MgCl ₂
------------------	---	-------------------	--

Antibiotikum	Stammlösung	Lösungsmittel	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml	50 % Ethanol	100 µg/ml
Zeocin	100 mg/ml		25 µg/ml

4.1.1 Bakterienkulturen auf Agarplatten

Für die Plattenkulturen wurde LB-Medium zusammen mit 15 g/l Agar-Agar autoklaviert. Nach Abkühlung auf 50 °C wurde geeignetes Antibiotikum zugegeben und in sterile Petrischalen gegossen. Zur Isolierung von Einzelkolonien wurden die transformierten Bakterien auf Agarplatten mit geeignetem Antibiotikum ausgestrichen und für 16 h bei 37 °C inkubiert.

4.1.2 Flüssigkulturen

Um Bakterien in großen Mengen für eine Plasmid- oder Proteinisolierung zu erhalten, wurden 1 bis 400 ml LB-Medium mit geeignetem Antibiotikum aus einer Glycerinkultur oder von einer einzelnen Kolonie einer Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 280 Upm geschüttelt.

4.1.3 Lagerung und Reaktivierung der Bakterienkultur

Bakterien einer Flüssigkultur wurden mit dem gleichen Volumen 97 %igen Glycerins vermischt und in Kryoröhrchen bei -20 °C gelagert. Für die Reaktivierung der Glycerinkulturen wurde die Plattenkultur oder Flüssigkultur mit einer Impfnadel angeimpft.

4.1.4 Herstellung chemokompetenter Bakterien

Die Zellen wurden 5 min zentrifugiert (4 °C, 1500 g) und das Pellet in 2 ml kalter 0,05 M CaCl₂-Lösung resuspendiert. Die Zellen wurden für einige Stunden auf Eis inkubiert, bevor sie mit 20 % Glycerin versetzt und in Aliquots à 200 µl bei -80 °C gelagert wurden.

4.1.5 Präparation elektrokompetenter Bakterien

20 ml einer Übernachtskultur wurde mit LB-Medium auf 500 ml verdünnt und bei 37 °C und 240 Upm für 3 h inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6 wurde die Bakterien für 30 min im

Eisbad abgekühlt und im Zentrifugenröhrchen für 15 min bei 2.000 g und 4 °C pelletiert. Das Zellpellet wurde auf Eis in 250 ml eiskaltem sterilem Wasser resuspendiert und jeweils für 15 min bei 2.000 g und 4 °C zentrifugiert. Danach wurde das Zellpellet in 20 ml einer eiskalten 10 %igen Glycerinlösung wieder resuspendiert und in zwei 50 ml Falconröhrchen überführt. Nach einer weiteren Zentrifugation für 15 min bei 4.000 g und 4 °C wurde das Zellpellet in 0,5 ml einer eiskalten 10 %igen Glycerinlösung aufgenommen. Schließlich wurden von den elektrokompenten Zellen 80 µl Aliquots in Eppendorff-Reagenzgefäße pipettiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80 °C gelagert.

4.1.6 Transformation kompetenter Bakterien

Das halbe Volumen eines Ligationsansatzes wurde mit 100 µl chemokompetenten Bakterien vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem ›Hitze-Schock‹ (42 °C, 2 min) wurden die Bakterien mit 1 ml TYM-Medium vermischt und für 1 h im Schüttler bei 37 °C inkubiert. Etwa 100 µl der Bakteriensuspension wurde anschließend auf vorgewärmten Agarplatten mit Antibiotikum ausgestrichen. Bei der Transformation durch Elektroporation wurden 80 µl elektrokompente Bakterien mit 3 µl Ligationsansatz vermischt und für 1 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in eine vorgekühlte Küvette mit 2 mm Elektrodenabstand pipettiert und bei 2,5 kV und 200 Ohm sowie 25 µF elektroporiert. Die Zellsuspension wurde in TYM-Medium überführt, für 60 min bei 37 °C geschüttelt und auf einer Agarplatte ausgestrichen.

4.2 Präparation und Analyse von DNA

4.2.1 Isolierung von Plasmiden aus Bakterien über alkalischen Schnellaufschluß

Geringe Mengen Plasmid-DNA wurden für die Überprüfung einzelner Klonierungen durch den Verdau mit Restriktionsendonukleasen oder für Sequenzierungen mit Hilfe des alkalischen Schnellaufschlusses präpariert. 1,5 ml LB-Medium einer Übernachtskultur wurde für 5 min bei 6.000 g zentrifugiert und das Pellet in 200 µl des Puffers P1 resuspendiert. Anschließend wurden 200 µl des Puffers P2 zugegeben und vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur für 5 Minuten wurde 200 µl des Puffers P3 zugegeben. Bakterielle Proteine, Zellreste und chromosomale DNA wurden abzentrifugiert (20.000 g, 15 min, 4 °C), die Plasmid-DNA im Überstand durch Zugabe von 2,5 Volumina 96 %igen Ethanol gefällt. Die Proben wurden für eine Stunde bei 4 °C inkubiert und anschließend zentrifugiert (15.000 g, 30 min, 4 °C). Die DNA-Pellets wurden mit Ethanol gewaschen, getrocknet und in H₂O aufgenommen.

P1	10 mM EDTA	P2	200 mM NaOH	P3	3 M KAc
	10 mg/ml RNaseA*		pH 5,5		
	50 mM Tris/HCl, pH 5,5				
	1 % SDS				

RNase 10 mM Tris-HCl, 100 µg/ml RNaseA pH 7,5 * 20 Minuten RNase aufkochen, bei RT langsam abkühlen lassen

4.2.2 Anionenaustauscher-Chromatographie

Für die Präparation größerer Mengen DNA wurde der Kit von JET-Star verwendet, in welcher der alkalische Aufschluß ergänzt wird um die Reinigung der Plasmid-DNA über eine Anionenaustauscher-Säule auf der Basis von modifiziertem Silicagel. Die Präparation der DNA erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Das DNA-Pellet wurde zweimal mit 96 %igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 1 ml H₂O gelöst.

Puffer QBT	750 mM NaCl	Puffer QC	1 M NaCl	Puffer QF	1,25 M NaCl
	50 mM MOPS		50 mM MOPS		50 mM MOPS
	15 % Ethanol		15 % Ethanol		15 % Ethanol
	pH 7,0		pH 7,0		pH 8,2

4.2.3 Analytische Schnellpräparation in Mikrotiterplatten

Bei diesem Verfahren wurden 600 µl Übernachtskulturen in 1,3 ml Röhrchen in einem FACS-Ständer angesetzt. Davon wurden dann 200 µl in eine Mikrotiterplatte übertragen, pelletiert und das Pellet in 40 µl Puffer 1 resuspendiert. Nach einer 5 minütigen Inkubation gleicher Menge an Puffer 2 wurde die Lösung mit 40 µl Puffer 3 vermischt. Die Mikrotiterplatte wurde für 15 min bei 10.000 g zentrifugiert und der Überstand anschließend auf eine neue Mikrotiterplatte übertragen. Mit je 150 µl absolutem Ethanol und anschließendem Zentrifugieren bei 10.000 g für 30 min ist die Plasmid-DNA dann gefällt und mit 200 µl Ethanol gewaschen und schließlich bei 10.000 g für 15 min zentrifugiert und an der Luft getrocknet worden. Die Plasmid-DNA ist zur Kontrolle gleich in der Mikrotiterplatte mit jeweiligen Restriktionsenzymen verdaut worden.

4.2.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA über Agarosegele

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte über Horizontalgele. In Abhängigkeit von der Größe der Fragmente wurde 0,8–2 % Agarose in 1x TBE verwendet, das wurde zur Detektion der DNA unter UV-Licht Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 µg/ml) zugesetzt. Vor dem Auftrag wurden die DNA-Proben mit 1/10-Volumen Probenpuffer versetzt. Für die Elektrophorese wurde 1x TBE-Laufpuffer verwendet und je nach Abstand der Elektroden eine Spannung von 80–200 Volt (6–10 V/cm) angelegt. Die Position der durch Ethidiumbromid angefärbten DNA wurde unter UV-Licht (366 nm) bestimmt.

10x TBE	0.9 M Tris-HCl	6 x Auftragspuffer	40 % Saccharose
	0.9 M Borsäure		0,2 % Bromphenolblau
	50 mM EDTA pH8		

4.2.5 Isolierung von DNA aus Agarosegelen durch Zentrifugation

Zwei 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden ineinander gesteckt, wobei der Boden des oberen Gefäßes gelocht wurde. Diese Öffnung wurde mit silanisierter Glaswolle abgedichtet. Agarose-Gelblöcke, die das gewünschte DNA-Fragment enthielten, wurden auf die Glaswolle gegeben. Die ineinander steckenden 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden in einer dafür geeigneten Zentrifuge für 20 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, so daß sich die DNA, mit dem im Gelblock enthaltenen Wasser, im unteren der beiden Eppendorf-Reaktionsgefäße sammelte. Diese DNA wurde anschließend mit Phenol/Chloroform extrahiert, mit 1 Vol Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (24:1) gereinigt und mit Ethanol und 10 % Vol 3 M NaAc pH 5,2 gefällt.

4.2.6 Isolierung von RNA

Eukaryotische Zellen wurden bei Raumtemperatur (RT) trypsiniert und mit PBS auf Eis gewaschen. Alle weiteren Schritte wurden bei RT gemacht. Nach dem Sedimentieren wurden die Zellen in 1 ml TRIzol-Reagenz resuspendiert und für 5 min inkubiert. Auf diese Suspension wurden 200 µl Chloroform gegeben, wiederum für 5 min bei 12.000 g zentrifugiert und mit 1 Vol Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (24:1) gereinigt. 550 µl der oberen klaren Lösung mit RNA wurden abgenommen und mit 550 µl Isopropanol für 10 min gefällt. Nach 10 minütigem Zentrifugieren bei 20.000 g wurde das Sediment mit 96 %igem Ethanol gewaschen und für weitere 5 min zentrifugiert. Das luftgetrocknete Sediment wurde in dest. Wasser aufgenommen, für 120 min bei 65 °C denaturiert und schließlich mit Ethanol (3x) und 3 M NaAc pH 5,2 (10 % des Gesamtvolumens) auf Eis gefällt. Das Präzipitat wurde in diesem Zustand in Ethanol bei -20 °C gelagert.

4.2.7 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Messung der Absorption wäßriger DNA- oder RNA-Lösungen bei 260 nm (A_{260}) in einer Quarzküvette gegen Wasser als Referenz, läßt folgende Beziehung zur Nukleinsäurekonzentration zu: Nukleinsäurekonzentration ($\mu\text{g/ml}$) = Faktor $\times A_{260}$. Da 1 OD bei 260 nm doppelsträngiger DNA 50 $\mu\text{g/ml}$ (40 $\mu\text{g/ml}$ =ssDNA oder RNA, 20 $\mu\text{g/ml}$ =ssOligo) entspricht, kann die Konzentration berechnet werden. Als Verunreinigungen treten häufig auch Phenolreste oder Proteine auf, die stark bei 280 nm absorbieren. Die Reinheit der Präparation läßt sich aus dem Quotienten von A_{260} / A_{280} abschätzen. Bei reinen Nukleinsäurepräparationen liegt der Wert des Quotienten zwischen 1,8 (reine DNA) und 2,0 (reine RNA).

4.2.8 Synthese einzelsträngiger cDNA für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Synthese gewünschter einzelsträngiger cDNA ist die reverse Transkriptase "Superscript" verwendet worden. Bis zu 10 µg Gesamt-RNA wurden in 10 µl DEPC-Wasser aufgenommen. Zu diesem Ansatz wurde 1 µl (1 pmol) Random-Primer gegeben und für 3 min bei 80 °C denaturiert. Dann wurden 4 µl 5x Transkriptasepuffer, 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl dNTP-Stammlösung, 1 µl RNAsin und 1 µl reverse Transkriptase (RTase) zugegeben. Die RT-Kontrolle wird ohne RTase angesetzt. Dieser Ansatz, der ein Gesamtvolumen von 20 µl hatte, wurde für 1,5 h bei 37 °C anschließend für 10 min bei 72 °C inkubiert. Zur Inaktivierung der RNA wurden 20 µl einer 0,4 M Natriumhydroxid-Lösung und nach weiteren 10 min zur Neutralisierung bei 37 °C 20 µl 1 M Tris/HCl (pH 7,5) zugegeben. Der Ansatz mit einem Endvolumen von 60 µl ist bei -20 °C gelagert worden.

4.2.9 Amplifizierung von DNA mittels der PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der *in vitro* Amplifizierung von einzel- und doppelsträngigen DNA-Fragmenten. Als Polymerase wurde "CombiPol" verwendet. Der PCR-Schritt wird in Gesamtvolumina von 25 µl oder 50 µl durchgeführt: 1x Polymerasepuffer, 1,5 mM MgCl₂, 0,2-0,4 mM dNTPs, 25 pmol 3'- und 5'-Primer, 1 µl cDNA, 1,25 U Polymerase. Bei Verwendung der "CombiPol" DNA-Polymerase mit 3'- 5'-Exonukleaseaktivität (um Fehler bei der DNA-Synthese zu korrigieren) war der Reaktionsansatz durch den mitgelieferten 5x Enhancer ergänzt worden. Für die Amplifikation wird das passende Zyklusprogramm durchgeführt.

Denaturierung: Erhitzen des Reaktionsansatzes auf 94 °C; **Primer-Anlagerung:** Anlagerungstemperatur lag gewöhnlich bei 55 °C; **Polymerisierung der komplementären DNA-Stränge:** Optimale Polymerisierungstemperatur war 72 °C, die Dauer des Polymerisierungsschritts variierte zwischen 30 s und 1 min, abhängig von der Größe des zu erwarteten Amplifikats. In den meisten Fällen wurde mit 35 Zyklen gearbeitet. Zur Überprüfung der Amplifikation der DNA wurde sie in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Für die Klonierung der amplifizierten cDNA wurden Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen in den PCR-Fragmenten genutzt, die oftmals über die Primer der PCR eingeführt wurden.

4.2.10 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Die Spaltungen wurden nach den Angaben der Hersteller in den jeweils mitgelieferten Puffersystemen und optional BSA durchgeführt. In der Regel wurden für 1 µg Plasmid-DNA 2 U Endonuklease verwendet und für 3 h bei geeigneter Temperatur inkubiert. Bei der Verwendung von hitzeinaktivierbaren Enzymen, wurden die Restriktionsansätze für 15 min auf die vom Hersteller des Enzyms empfohlene Temperatur erhitzt. Die DNA des

Restriktionsverdau-Ansatzes wurde auf einem Agarosegel kontrolliert und gewünschte DNA-Fragmente daraus isoliert.

4.2.11 Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase

Zur Verhinderung einer Rezirkularisierung von linearisierten Plasmiden wurden diese mit 1 U/ μ l alkalischer Phosphatase bei 37 °C im gleichen Restriktionspuffer inkubiert. Als Enzym wurde "*calf intestine alkaline Phosphatase*" (CIP) verwendet. Der Reaktionsansatz wurde zur Inaktivierung der CIP für 10 min auf 70 °C erhitzt.

4.2.12 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die kovalente Verknüpfung zweier DNA-Stränge durch die Bildung einer Phosphodiester-Brückenbindung zwischen phosphoryliertem 5'-Ende und dem 3'-Hydroxylende wurde der linearisierte Vektor mit äquimolarer Menge an DNA-Fragment zusammengegeben und in einem Gesamtansatz von 20 μ l mit 1 μ l des mitgelieferten 10x Puffers und mit 1 U T4 -Ligase 2 h bei 16 °C oder über Nacht bei 4 °C inkubiert.

10x T4-DNA-Ligase-Puffer	700 mM Tris-HCl pH 7,6	10 mM DTT
	100 mM MgCl ₂	10 mM ATP

4.2.13 Sequenzierung der Plasmid-DNA

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte mit dem "*Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP*". Die PCR wird durch Einbau eines spezifischen Didesoxynukleotids zufällig abgebrochen. Die dabei eingebauten 5'-fluoreszenzmarkierten Primer werden nach Laseranregung auf dem Sequenzgel detektiert. An Stelle von ddGTP wird in diesem ›Kit‹ 7-Desaza-dGTP verwendet, um Bandenkompressionen im Gel zu minimieren. 4 pmol 5'-fluoreszenzmarkierter Primer und 1 μ g Plasmid-DNA wurden in 19,6 μ l Wasser gelöst. Nach Zugabe von 1,4 μ l DMSO ist der Ansatz auf vier 4,5 μ l-Aliquots verteilt und jeweils 1,5 μ l der Reagenzien A, C, G und T zugegeben worden, in denen sich neben der Thermo-Sequenase-DNA-Polymerase auch die Desoxynukleotide und jeweils eines der Didesoxynukleotide ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP befanden.

Die Ansätze sind dann mit etwa 30 μ l Mineralöl überschichtet und die PCR mit folgendem Programm 1 gestartet und weiter über 30 Zyklen mit Programm 2-4 fortgesetzt:

1	2	3	4
2 min, 94 °C	15 sek, 94 °C	15 sek, 50 °C	30 sek, 72 °C

Nach der PCR wurden zu jedem Ansatz 3 μ l Probenpuffer gegeben. Die Auftrennung von einzelsträngigen DNA-Molekülen erfolgte über denaturierende Polyacrylamid-Harnstoffgele.

4.2.14 Sequenzier-Gelelektrophorese

Nach der Zugabe von 40 µl TEMED und 400 µl 10 % Ammoniumperoxodisulfat (APS) auf 60 ml Gellösung wurde das Gel durch einen Sterilfilter luftblasenfrei zwischen die beiden Glasplatten gegossen, der Vorkamm an der oberen Gelkante eingesetzt und arretiert. Nach Polymerisierung wurde das Gel vertikal in den Sequenzer Li-Cor 4200L (MWG Biotech) eingespannt und die Pufferkammern mit 1x TBE gefüllt. Nach einer Vorlaufzeit von etwa 30 min wurden 1,2 µl der Probe aufgetragen. Die Detektion der DNA-Fragmente erfolgte über die Anregung von Fluoreszenzfarbstoffen mittels des eingebauten Lasers und die Erfassung der Fluoreszenz über eine entsprechende Optik. Die Auswertung der Banden erfolgte am Rechner.

30 cm Gel	7 M Harnstoff 1x TBE 8 % Polyacrylamid	44 cm Gel	7 M Harnstoff 1x TBE 6 % Polyacrylamid	66 cm Gel	6 M Harnstoff 1x TBE 4 % Polyacrylamid 0,8 % DMSO
10x Long Run TBE	1340 mM Tris 45 mM Borsäure 25 mM EDTA	Probenpuffer	95 % Formamid 10 mM EDTA pH 9,0 0,1 % Fuchsin (basisch) 0,01 % Bromphenolblau		

4.3 Kultur von Säugetierzellen

Einfrieren der Zellen: Die Zellen wurden 2 min bei 300 g zentrifugiert, in Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen gefüllt. Nach Abkühlung auf -80 °C wurden sie in flüssigen Stickstoff überführt.

Auftauen der Zellen: Nach raschem Auftauen wurden die Zellen in entsprechendem Medium aufgenommen.

Einfriermedium 90 % FKS, 10 % DMSO

4.3.1 Kultivierung von Zelllinien

Die Säugetierzellen wurden bei 37 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ gehalten. Suspensionszellen (Jurkat-, Raji-Zellen) wurden in RPMI Medium, adhärenente Zellen (HEK293-, MDA-MB435S1-Zellen) in DMEM Medium kultiviert. Adhärenente Zellen wurden je nach Konfluenz mit Trypsinlösung gesplittet. Bei der Kultivierung stabil exprimierender Zelllinien wurde dem Medium zudem der entsprechende Selektionsmarker (z. B. 400 µg/ml G418 oder 300 µg/ml Zeocin) hinzugegeben. Zur Behandlung von unkomplizierten Infektionen wie Mykoplasmen wurden die Zellen über 10 Tage mit 10 µg/ml Ciprobay kultiviert.

RPMI Medium	500 ml RPMI 1640 50 ml FKS 5 ml 100 x Stammlsg. Pen/Strep	DMEM Medium	500 ml DMEM 50 ml FKS 5 ml 100 x Stammlsg. Pen/Strep
--------------------	---	--------------------	--

Trypsinlösung	0,25 % Trypsin
	0,05 % EDTA
	PBS-d

4.3.2 Zellzahlbestimmung

Zellen wurden im Verhältnis von 1:1 mit 3 %iger Trypanblau-Lösung verdünnt, wobei tote Zellen vom blauen Farbstoff angefärbt wurden. In einer Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Bei Auszählung aller 4 großen Felder ergab sich folgende Beziehung:

Zellen/ml (= gezählte Zellen)/ 4 x Verdünnung x 10^4 .

4.4 Proteinexpression in Säugetierzellen

Für die Chemokinexpression in MDA-MB435S1-Zellen wurden das pZeoSV2+ Plasmid verwendet. Die Chemokinexpression steht unter der Kontrolle des "early" Enhancer/Promotor-Komplexes aus dem Affenvirus SV40. Die transfizierten Zellen wurden auf Zeocin selektioniert. Für die Chemokinrezeptoren wurde das pcDNA3.1-Plasmid verwendet. Dabei steht der Rezeptor unter der Kontrolle des "immediate-early"-Promotors aus dem Cytomegalovirus. Die transfizierten Zellen wurden auf G418 selektioniert.

4.4.1 Transfektion von Säugetierzellen

4.4.1.1 Kalziumphosphat-Methode

Die Kalziumphosphat-Methode wurde bei adhärenz wachsenden Zellen, MDA-MB435S1, HEK293 und CHO-K1, angewendet. Für 1 ml Transfektionsansatz wurden 50 µl einer 2,5 M CaCl_2 -Lösung, 10-20 µg Plasmid-DNA und Wasser auf ein Gesamtvolumen von 0,5 ml aufgefüllt, die dann unter ständigem Durchmischen tropfenweise zu 0,5 ml vorgelegtem 2x HEBS-Puffer zugegeben wurden. Die Lösung wurde gleichmäßig auf die maximal 70 % konfluent gewachsenen Zellen getropft. Das Präzipitat wurde über Nacht auf den Zellen belassen, bevor die Zellen mit PBS gewaschen und für verschiedene Analysen geerntet wurden. Für die Klonierung wurden die Zellen 24 h nach Transfektion gesplittet und in das geeignete Medium überführt.

2x HEBS-Puffer	280 mM NaCl	10 mM Glukose
	1 mM KCl	40 mM HEPES
	1,1 mM Na_2HPO_4	pH 7,08

4.4.1.2 Transfektion von Suspensionszelllinien durch Elektroporation

Die Zellen wurden in RPMI-Medium auf eine Konzentration von 2×10^7 Zellen/ml eingestellt. 0,8 ml dieser Zellsuspension wurden mit 20 µg Plasmid-DNA vermischt, in eine sterile Elektroporationsküvette mit 4 mm Elektrodenabstand gefüllt und bei 300 V und 1070 µF

elektroporiert. Nach Resuspendierung wurden die Zellen in entsprechendem Medium ausgesät.

4.4.2 Selektion stabil exprimierender Zelllinien

Die Selektion von stabilen Zelllinien erfolgte über die Zugabe der Antibiotika Zeocin (300 µg/ml) und G418 (400 µg/ml). Zeocin selektioniert Zellen, die ein Plasmid mit einem Zeocin-Resistenzgen (z.B. pZeoSV2+) im Genom integriert haben, während G418 die Zellen selektioniert, die ein Plasmid mit einem Neomycin-Resistenzgen (z.B. pcDNA3) im Genom integriert haben.

4.4.2.1 Selektion und Sortierung von Suspensionszellen

Einen Tag nach Transfektion wurden die Zellen mit entsprechendem Antibiotikum in Maximalkonzentration unter Selektion gesetzt. Das Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Nach einer Woche wurde die Menge des Antibiotikums reduziert. Unmittelbar nachdem sich die Zahl der überlebenden Zellen wieder leicht erhöht hatte, wurden die Zellen mit Antikörpern für den entsprechenden Rezeptor markiert und entweder mit Hilfe der Durchflußzytometrie im FACS-Sorter oder über anti-PE MicroBeads in einer Separations-Säule nach Expression sortiert (Jurkat CCR7 Pool).

4.4.2.2 Selektion von adhärenenten Zellen

Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen gesplittet und dann mit der maximalen Menge des entsprechenden Antibiotikums unter Selektion gesetzt. Das Medium wurde dreimal wöchentlich gewechselt. Nach 10 Tagen wurde die Menge des Antibiotikums reduziert. Die hochgewachsenen Antibiotikaresistenten Kolonien wurden nach Entfernung des Mediums unter dem Lichtmikroskop mit 50 µl Trypsinlösung unter mehrmaligem Auf- und Abpipettieren abgelöst und in Lochplatten mit Selektionsmedium überführt. Nachdem die Expression des jeweiligen Proteins mit Hilfe der Durchflußzytometrie in den einzelnen Zellklonen kontrolliert wurden und sind diese anschließend eingefroren worden.

4.4.3 Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie wurde angewendet, um die Oberflächen- und intrazellulär lokalisierte Expression von Proteinen in Säugetierzellen nachzuweisen. In einem Flüssigkeitsstrahl wurden Einzelzellen durch einen Laserstrahl gelenkt, so daß verschiedene Parameter wie Fluoreszenzsignale und Lichtstreuung für jede einzelne Zelle bestimmt werden können. Die markierten Zellen wurden mit dem Durchflußzytometer "FACScan" (Becton-Dickinson) gemessen und mit der PC-Version 3.0 des Programms "Winlist" analysiert.

4.4.4 Nachweis intrazellulärer Epitope

Zur Untersuchung der Expression intrazellulärer Chemokine (z.B. CCL19 oder CCL21) wurden die Zellen für 2 h in 10 µg/ml BrefeldinA inkubiert. Dann wurden die Zellen in frisch hergestellter 3 %iger Paraformaldehyd-Lösung (in PBS-d) aufgenommen und für 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit PBS-d gewaschen und in 0,0025 % Digitonin in PBS-d für 7 min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Nach dem Waschen in PBS wurden die Zellen resuspendiert und die Färbung wurde mit spezifischen Antikörpern gegen das Protein (z.B. CCL19 oder CCL21) durchgeführt.

4.4.5 Isolierung membranständiger und intrazellulärer Proteine

Für den Nachweis intrazellulärer und membranständiger Proteine werden die Zellen lysiert und die zytoplasmatische Fraktion nach Sedimentierung der Membran und Organellen auf 4 °C aufgenommen. Für den Nachweis intrazellulärer Proteine werden die Zellen mit BrefeldinA, wie in Kapitel 4.4.4 beschrieben, blockiert. Nachdem die Zellen auf Eis für 15 min lysiert worden waren, wurden die Zellkerne bzw. Organelle bei 10.000 g pelletiert. Sowohl die aus der Membran herausgelösten als auch die zytoplasmatischen Proteine befinden sich im Überstand. Gelösten CCR7 Proteins darf nicht eingefroren und hitzedenaturiert werden, da es sonst nicht mehr im SDS-Gellauf aufgetrennt werden kann.

Lysispuffer PBS und 1 % NP40

4.4.6 Immunpräzipitation von Proteinen

Nach der Lyse erfolgt die Immunpräzipitation indirekt über spezifische Antikörper. 20 µl Protein-G-Sepharose, eine polymere Matrix, wurde pro Probe mit 1 ml Hybridomüberstand oder gereinigten Antikörpern bei 4 °C für 1 h beladen. Nach mehrmaligem Waschen der pelletierten Sepharose-Kügelchen mit Lysispuffer wurde das Zellysate mit der beladenen G-Sepharose für eine Stunde bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Um unspezifische an Protein-G-Sepharose gebundene Proteine zu entfernen, wurde mit Lysispuffer gewaschen.

4.4.7 Auftrennung von Proteinen in Polyacrylamidgelen (Glycingele)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden nach der Lämmli-Methode (Lämmli, 1970) eingesetzt, bei der die Proteine über die Kombination Trenngel und Sammelgel getrennt und ihre Größe bestimmt werden.

Die Polymerisierung der Gele wurde durch die Zugabe von TEMED und APS gestartet. Das Trenngel, das die Proteinproben aufkonzentriert, wurde unmittelbar nach dem Gießen mit Isopropanol überschichtet und erst nach vollständiger Polymerisierung mit dem Sammelgel überschichtet. In das Sammelgel wurde ein Taschenkamm justiert, der die Taschen für die Proben ausspart.

Trenngel	8 %	10 %	15 %	Sammelgel
dH ₂ O	17,5 ml	15 ml	8,8 ml	6,1 ml
1,5 M Tris pH 8,8	9,5 ml	9,5 ml	9,5 ml	2,5 ml 0,5 M Tris pH 6,8
Acrylamid 30 %	10 ml	12,5 ml	18,8 ml	1,3 ml
SDS	375 µl	375 µl	375 µl	100 µl
10 % APS	125 µl	125 µl	125 µl	50 µl
TEMED	25 µl	25 µl	25 µl	10 µl

Anschließend sind jeweils 2 Gele in eine Vertikal-Gelkammer (Mini-Protean, Biorad) oder ein großes Gel eingespannt worden, die mit 1x Elektrophoresepuffer gefüllt wurde. Die Proteinproben sind mit 4x Probenpuffer gemischt und danach sofort aufgetragen worden. Nach dem Auftragen der Proben wurde die Elektrophorese bei 100 V durchgeführt.

Trenngelpuffer	0,1 % SDS 1,5 M Tris/HCl pH 8,8	Sammelgelpuffer	0,1 % SDS 0,5 M Tris/HCl pH 6,8
Polyacrylamidlösung	30 % Acrylamid; 0,8 % Bis-Acrylamid		
5x Elektrophoresepuffer (1l)	15,1 g Tris 40 ml Glycerin (100 ml) 72 g Glycin 5 g SDS		4x Probenpuffer 2,5 g Tris/ HCl, pH 6,8 10 % Mercaptoethanol 4 g SDS 2 mg Bromphenolblau

4.4.8 Transfer und Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen

4.4.8.1 Transfer nach der Western Blot Methode

Der Transfer von Proteinen aus dem Polyacrylamidgel auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran wurde mit der Mini-Blot Apparatur im Naßverfahren oder im *Semi-dry*-Verfahren mit der Blot-Apparatur (BioRad, Trans-Blot SD) durchgeführt. Dazu wurden das Polyacrylamidgel und eine PVDF-Membran, die zuvor für 30 s in Methanol aktiviert wurde, für mehrere Minuten in Blotpuffer eingetaucht. Die Whatmanpapiere wurden mit Blotpuffer angefeuchtet und in der richtigen Reihenfolge luftblasenfrei mit dem Gel und der Membran in die Blotapparatur aufeinandergelegt eingespannt. Die Blotkammer (Mini-Blot Apparatur) wurde mit Blotpuffer gefüllt und auf Eis gestellt. Der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurde für die Mini-Blot Apparatur 1 h bei 70 V durchgeführt, im *Semi-dry*-Blot 20 V für 1 h. Nach der Immobilisation der Proteine auf der Membran wurde die Membran in TBS-T gewaschen.

Blotpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glyzin, 10 % Methanol
-------------------	--

4.4.8.2 Nachweis von immobilisierten Proteinen auf PVDF-Membran mit Antikörper

Auf der Membran lassen sich nun die darauf immobilisierten Proteine mittels spezifischer Antikörper nachweisen. Nach dem Proteintransfer wurde die PVDF-Membran für 30 min in Blockierlösung, 10 % Magermilchpulver in TBST, geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen für Antikörper zu blockieren. Nach darauf folgendem Waschschrift mit TBST oder TNT für 5 min wurde der Primärantikörper (mindestens 0,5 µg/ml aufgereinigter Antikörper oder Hybridomüberstand) auf die PVDF-Membran gegeben. Nach 90 min wurden wiederum 3 Waschschriffe (1x 15 min, 2x 5 min) mit TBST eingelegt, bevor 10 ml des Sekundärantikörpers in einer vom Hersteller empfohlenen Verdünnung gegeben wurden. Nach drei weiteren Waschschriffen (1x 15 min, 2x 5 min) mit TBST wurden die mit dem Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper inkubierten PVDF-Membranen dem Chemolumineszenz-Nachweis unterzogen.

TBST	150 mM NaCl 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 0,05 % Tween-20	TNT	150 nM NaCl 100 nM Tris-HCL, pH 7,5 0,05 % Tween-20
-------------	--	------------	---

4.4.8.3 Chemolumineszenz-Nachweis

Der Chemolumineszenz-Nachweis wurde mit Hilfe des ECL-Verfahrens durchgeführt. Dabei wurden pro Membran je 1 ml der Reagenzien 1 und 2 gemischt und auf die Membran getropft. Nach Abtropfen der Reagenzien wurde der Blot in Zellophanfolie gewickelt und damit ein Röntgenfilm belichtet.

4.4.9 Radioaktive *in vitro* Phosphorylierung

Bei dieser Methode erfolgte die *in vitro* Phosphorylierung von CCR7 nach Liganden-zugabe in stabil exprimierenden Zellen, MDA-MB435S1- (CCR7 Klon 1) oder Jurkat-Zellen (CCR7 Pool). Es wurden 2×10^6 der Zellen ausgesät, am folgenden Tag mit Waschpuffer gewaschen und für 1 h bei 37 °C mit serum- und phosphatfreiem Medium inkubiert. 1 mCi werden für eine weitere Stunde dem Medium beigegeben. Nach einer inversen Zeitkinetik wurde die Stimulation der Zellen mit eiskaltem PBS beendet und die Zellen weiterhin auf Eis gehalten. Bei Suspensionszellen (Jurkat-Zellen) wurden nach verschiedenen Zeitpunkten ein konstantes Volumen der Zellsuspension abgenommen und diese wurden bis zur weiteren Aufarbeitung in eiskaltem PBS gehalten. Nach dem Waschen mit eiskaltem PBS inkubierten die Zellen in 1 ml Lysispuffer für 30 min; das Zellysat wurde anschließend bei 10.000 g für 15 min in der gekühlten Tischzentrifuge pelettiert. Zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen des Rezeptors CCR7 an Rattenantigene oder Rattenimmunglobuline wurde das Zellysat für 30 min mit Protein G-Sepharose und Rattenserum inkubiert. Anschließend wurde das gereinigte Zellysat für die Immunpräzipitation (IP) verwendet. 1/4 des Volumens wurde für den Western Blot verwendet, anhand dessen die eingesetzte CCR7 Proteinmenge im

Immunpräzipitat bestimmt werden kann. Die restlichen 3/4 Vol wurden auf ein 13 %iges SDS-Polyacrylamidgel geladen, das mit Coomassie gefärbt und dann getrocknet wurde. Die radioaktive *in vitro* Phosphorylierung von Proteinen über radioaktiv markiertes Phosphat wurde autoradiographisch durch Auflegen eines Röntgenfilms ausgewertet.

Waschpuffer	20 mM Hepes	Lysispuffer	PBS	1 mM Na ₃ VO ₄
	140 nM NaCl		1 mM PMSF	10 mM NaF
	pH7		5 mM EDTA	1 % NP40

4.4.10 Tunicamycin-induzierte Inhibition der N-Glykosylierung

4.4.10.1 *Metabolische Markierung mit ³⁵S-Met/-Cys*

24 h nach transienter Transfektion mit CCR7 von HEK293-Zellen in 6 cm Schalen, wurde den Zellen alternativ 10 µg/ml Tunicamycin oder DMSO zugegeben und für 90 min inkubiert. Nachdem die Zellen durch Trypsinieren in Falconröhrchen überführt worden waren, wurden die Zellen mit DMEM ohne Met/Cys und 5 % dialysiertem FKS für 30 min ausgehungert. Dann wurde das Medium mit 2 ml DMEM ohne Met/Cys und 100 µCi ³⁵S-Met/-Cys ausgewechselt und weiterhin mit DMSO oder 10 µg/ml Tunicamycin für 2,5 h kultiviert. Die Blockierung der N-Glykosylierung wurde mit kaltem PBS gestoppt, woraufhin die Zellen bei 4 °C in 900 µl PBS, 1 % Triton100, 1,5 mM PMSF und 5 mM EDTA für 30 min lysiert wurden. Nach Sedimentierung der Zellkerne wurde davon 3 mal 10 µl für TCA-Fällung auf Whatmanpapier gespottet und der Rest für die Immunpräzipitation (IP) verwendet.

4.4.10.2 *TCA-Fällung der Zellysate*

Die TCA-Fällung des Zellysats diente zur Kontrolle des Gesamtmetabolismus nach Behandlung mit Tunicamycin in transient transfizierten HEK293-Zellen. Nachdem das Whatmanpapier mit dem Zellysate in 5 %iger TCA-Lösung getränkt worden war (damit die Spots weiterhin feucht bleiben), wurde dieses für 10 min bei RT leicht geschüttelt; für zwei weitere Male wird das Whatmanpapier in TCA-Lösung je 10 min inkubiert. Damit es leichter lufttrocknet, ist es für 3 min bei RT in 100 % Ethanol getränkt worden. In den Szintillationsröhrchen wird neben dem Whatmanpapier 5 ml der Szintillationslösung zugegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Mit dem beta-Counter wurde dann die Menge an gefällttem Protein gemessen. Tunicamycin-Behandlung hatte keinen großen Einfluß auf den Gesamtmetabolismus der HEK293-Zellen (Daten nicht gezeigt).

4.5 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung wurde grundsätzlich in Mikrotiterplatten durchgeführt. Nach Pelletierung der Zellen für 2 min bei 300 g und 4 °C wurden die Zellen mit Serum blockiert. Die Zellen können dann im Anschluß daran direkt mit 30 µl Antikörperlösung für 30 min auf

Eis inkubiert oder vor Antikörperzugabe permeabilisiert werden. Nach zwei Waschschritten mit PBS-d wurden die Zellen für 2 min bei 300 g und 4 °C zentrifugiert und gegebenenfalls mit einem zweiten Antikörper (Fluoreszenz- oder Biotin-markierter anti-Immunglobulin Antikörper) oder einer dritten Färbelösung (Fluoreszenz-markiertes Streptavidin) inkubiert. Zur Analyse sind die Zellen in 50 µl PBS-d aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt worden.

4.5.1 Immunfluoreszenzfärbung von Gefrierschnitten

Die Immunfluoreszenzfärbung fand nach Fixierung statt und wurde in den Färbekammern der Firma Shandon durchgeführt. Alle Schnitte wurden zuerst mit entsprechendem 5 % Blockserum (Rattenserum, Mausserum oder Ziegenserum) für 30 min bei RT blockiert. Anschließend wurden die Schnitte mit Primärantikörper in Blockserum für 90 min inkubiert. Abhängig vom Primärantikörper (unmarkiert, biotinyliert oder mit Fluoreszenzfarbstoffgekoppelt) wurden die Schnitte weiter mit passendem Antikörper oder gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen inkubiert. Für die Detektion der Chemokine wurde das Tyramid-Verstärkersystem verwendet und nach Herstellerangaben eingesetzt. Zur Färbung von Aktinfilamenten wurde Fitc-gekoppeltes Phalloidin verwendet, wobei die Zellen mit 3,5 % PFA und Lysophosphatidylcholin permeabilisiert und mit Phalloidin-Fitc gefärbt wurden. Zuletzt wurden die noch feuchten Schnitte mit Moviol luftblasenfrei eingedeckt. Das Moviol wurde bei 37 °C für 3 h getrocknet. Alle Schnitte wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop der Firma Leica begutachtet und je eine Aufnahme gemacht.

Moviollösung** 6 g Glycerin, 2,4 g Moviol, 12 ml 0,2 M Tris/HCl, pH 8,5

**bei 50 °C unter ständigem Rühren lösen oder in der Mikrowelle

4.5.2 Phalloidinfärbung

Mit dem Phallotoxin, Phalloidin, wurden spezifisch F-Aktine angefärbt, wodurch die Zytoskelettstruktur untersucht werden kann. Bei der Migration wird das Zytoskelett umgebaut; in der Immunhistochemie wird die Umlagerung von F-Aktin bestimmt. In die Zellen wurden in 1 ml Lösung mit 50 µg/ml Lysopalmitoylphosphatidylcholin 5 Units von Fitc-markiertem Phalloidin und frischem 4 % Paraformaldehyd aufgenommen und bei 4 °C für 20 min inkubiert. Die Umlagerung des F-Aktins von Zellen auf Objektträger wurde nach 20 minütiger Stimulation gemessen.

4.6 Herstellung von Organschnitten

Die Hälfte des entnommenen Organs (Lunge, Milz, Leber und Niere) wurde in Tissue-Tek für Gefrierschnitte eingebettet, während die andere Hälfte für die FACS-Analyse in Kultur gehalten wurde. Von den Peyer'sche Plaques (PP) wurden jeweils zwei präpariert und je ein Plaque für Gefrierschnitte und (nach Kultivierung in Zellkultur) für die FACS-Analyse

verwendet. Die Lymphknoten wurden so aufgeteilt, daß der drainierende Lymphknoten (ALN) für den Gefrierschnitt verwendet wurde. Der gegenüberliegende ALN hinsichtlich der Metastasen in der FACS-Analyse untersucht wurde. Die verwendeten Organe werden vor Einbettung in Tissue-Tek mit PBS gewaschen, dann auf Trockeneis eingefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Zum Schneiden mit dem Mikrotom wurden die Organe auf die geeignete Temperatur gebracht (variierte von -12 bis $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ abhängig vom Fettgehalt des Gewebes), und mit einer Schnittdicke von $12\text{ }\mu\text{m}$ auf die beschichteten Objektträger gegeben. Die Schnitte wurden für 3 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder RT über Nacht getrocknet und mit eiskaltem Aceton für 10 min fixiert. Diese Schnitte können dann für mehrere Monate bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

4.6.1 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung diente als Übersichtsfärbung der Organe. Gefrierschnitte werden in Hämatoxylin (Sigma) für 30 min eingelegt und danach unter fließendem Wasser gebläut. Nachdem der Objektträger gespült wurde, wurde er für 30 min in Eosin-Lösung inkubiert. Die Schnitte wurden mit Wasser gespült und in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert ($70\text{ }\% < 85\text{ }\% < 100\text{ }\%$) und am Ende 2x mit Xylol gewaschen. Die gefärbten Schnitte wurden mit Entellan (Merck) eingedeckelt.

Eosin-Lösung 1g Eosin in 1000 ml Aqua dest.

4.7 Isolierung von Lymphozyten aus Organen

Bei Organpräparationen wurden die Organe auf Eis in PBS-d zerkleinert, durch ein Haushaltssieb gerieben und anschließend durch Gaze gespritzt. Nach Überführung in ein 15 ml Spitzröhrchen konnten sich die Zellen absetzen. Organpräparationen, die stark von Erythrozyten kontaminiert sind, wurden im 14fach Volumen 1x Erythrozyten-Lysispuffer für 3 min bei RT lysiert. Nach Zentrifugation für 15 min bei $300\times g$ unter Zugabe von FKS wurden die isolierten Zellen gezählt.

10x Erythrozyten-Lysispuffer	0,5 g Kaliumhydrogenkarbonat	pH 7,3
	4,49 g Ammoniumchlorid	ad 50 ml Wasser
	18,5 mg EDTA	

4.8 Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration

4.8.1 Spektralfluorometrische Bestimmung der zytosolischen Konzentration von Ca^{2+} -Ionen

FURA 2-acetoxymethylester (1 mM FURA2/AM in DMSO) ist ein membrangängiger Ca^{2+} -Chelator, dessen Fluoreszenzspektrum sich im Ca^{2+} -bindenden und ungebundenen Zustand unterscheidet. Intrazelluläre Esterasen modifizieren das Molekül, so daß es die Änderungen der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration anzeigen kann. Mit der Kalzium-Sättigung ändert sich

auch die Intensität der emittierten Fluoreszenzstrahlung in Abhängigkeit von der Wellenlänge des einstrahlenden Lichts. Zur Anregung wird Licht der Wellenlängen 340 und 380 nm (geringe Kalziumkonzentration) verwendet, die Emission von Fluoreszenzstrahlung wird stets bei 510 nm gemessen. Adhärent wachsende Zellen wurden pelletiert und mit Ca^{2+} -freiem HBSS bei Raumtemperatur durch Zentrifugation gewaschen (350 g, 5 min, RT). Die Zellen wurden in HBSS auf eine Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml eingestellt, FURA2/AM zu einer Endkonzentration von $1 \mu\text{M}$ hinzugegeben und 30 Minuten im CO_2 -Brutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Ca^{2+} -freiem HBSS zweimal gewaschen und bis zur Messung auf Eis gestellt. Vor der Messung wurden die Zellen in Ca^{2+} -haltigem HBSS je 2,5 ml und 37°C auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml aufgenommen und in der Quarzküvette gemessen. Der Stimulus wurde unter Rühren zugegeben. Zur Kalibrierung der einzelnen Messungen wurde gegen Ende jeder Messung die maximale Fluoreszenz bei Sättigung aller Farbstoffmoleküle mit Ca^{2+} -Ionen durch Zugabe von Triton X-100 zu einer Endkonzentration von 0,05 % und anschließend die minimale Fluoreszenz durch Zugabe von EGTA zu einer Endkonzentration von 5 mM bei einem pH-Wert von 8,5 bestimmt.

Hanks balanced salt solution (HBSS)	5.4 mM KCl	0.5 mM MgCl_2
	0.3 mM Na_2HPO_4	0.6 mM MgSO_4
	0.4 mM KH_2PO_4	5.6 mM D-Glukose
	4.2 mM NaHCO_3	137 mM NaCl
	1.0 mM CaCl_2	ad 1 Liter H_2O , pH 7.4

4.9 Liganden-induzierte Internalisierung von CCR7

Die Oberflächenexpression von CCR7 wurde mit Zellkulturüberstand des Hybridoms 3D12 (anti-CCR7) bestimmt. Als Negativkontrolle wurde der Zellkulturüberstand des Hybridoms 8B2 (anti-CXCR5) verwendet. Die Färbung mit anti-CXCR5 zeigte gleiche mittlere Fluoreszenz-Intensität wie die Isotypkontrolle von anti-CCR7. Die Oberflächenexpression berechnet sich aus der Differenz der mittleren Fluoreszenz-Intensität mit anti-CCR7 und anti-CXCR5. Die Liganden-induzierte Internalisierung von CCR7 wurde durchflußzytometrisch mit den Antikörpern 3D12 und 8B2 bestimmt. Die Abnahme der Oberflächenexpression von CCR7 korreliert mit der Änderung der Fluoreszenz-Intensität, wobei der Referenzwert immer die unstimulierten Zellen darstellen. Die adhärent wachsenden Zellen wurden mit PBS und 5 mM EDTA von den Kulturschalen gelöst, zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und in RPMI auf eine Konzentration von 6×10^6 Zellen/ml eingestellt. Die Zellen wurden auf 4°C oder 37°C gestellt. Mit verschiedenen Inhibitoren von sekundär-induzierten Signalwegen wurden die Zellen vor Ligandenzugabe für 1 h bei 37°C inkubiert. Zu den jeweiligen Ansätzen wurde CCL19 oder CCL21 zu einer Endkonzentration von 100 nM zugegeben. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden den Gefäßen Aliquots entnommen, sofort in eiskaltem PBS (mit 5 mM EDTA und 0,1 % NaN_3) verdünnt und bis zur Messung auf Eis gelagert. Die Bestimmung der Zahl der auf der Oberfläche verbliebenen Rezeptoren erfolgte durchfluß-

zytometrisch mit Antikörpern. Es konnte gezeigt werden, daß die CCR7-gebundenen Liganden (CCL19 und CCL21) die Rezeptorbindung von anti-CCR7 nicht beeinflussten (4 °C Daten nicht gezeigt). Um die Oberflächenexpression von CCR7 zu bestimmen, wurde eine Probenhälfte für die FACS-Messung mit anti-CCR7, die andere mit anti-CXCR5 als Kontrolle, inkubiert. Um den zeitlichen Verlauf der Liganden-induzierten Internalisierung zu berechnen (d.h. die relative Oberflächenexpression), wurde die Oberflächenexpression der einzelnen Proben zu verschiedenen Zeitpunkten im Vergleich zur Oberflächenexpression zum Zeitpunkt Null bestimmt. Um den Einfluß verschiedener Inhibitoren für intrazelluläre Effektormoleküle auf die Liganden-induzierte Internalisierung von CCR7 zu bestimmen, wurde zuerst, wie oben besprochen, die relative Oberflächen-expression von CCR7 bestimmt. Um den zeitlichen Verlauf der Liganden-induzierten Internalisierung in Abhängigkeit der Inhibitoren zu berechnen, wurde zu gleichen Zeitpunkten der Entnahme die Oberflächen-expression unstimulierter und CCL19- oder CCL21-stimulierter Zellen verrechnet.

4.10 Chemokin-induzierte Migration von MDA-MB435S1-Zellen im Migrations-Assay

Um das *in vitro* Migrationsverhalten von MDA-MB435S1-Zellen auf bestimmte Stimuli hin zu untersuchen, wurde die gerichtete Migration in einer Boyden-Kammer getestet. Die Polykarbonatmembran mit einer Porengröße von 10 µm wurde mit murinem Kollagen (Typ IV, 20 µg/ml in 0,05 M HCl) für 24 Stunden bei 4 °C beschichtet. Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurde die Membran mit RPMI gewaschen. Die Zellen wurden für 2 Minuten mit 1 ml Trypsin-Lösung inkubiert und sofort nach Ablösen mit RpmI-PufferI gewaschen. Das Zellpellet wurde in RpmI-PufferI resuspendiert und alternativ mit 0,1 µM FTY720 oder PKC-Inhibitoren oder RpmI-PufferI für 60 min auf 37 °C inkubiert. In den unteren Kompartimenten der Kammern wurden die Chemokine, in RpmI-PufferI gelöst, vorgelegt, die beschichtete Polykarbonatmembran aufgelegt und nach dem Zusammenbau der Apparatur 50 µl der Zellsuspension (5×10^5 Zellen/ml) in die oben gelegenen Kompartimente der Kammern pipettiert. Die Boyden-Kammer wurde für 8 oder 16 h bei 37 °C im CO₂-Brutschrank inkubiert. Nur die auf der Unterseite der Membran transmigrierten Zellen wurden mit DiffQuik fixiert und blau gefärbt. Zellen auf der Oberseite der Polykarbonatmembran wurden vor der Fixierung und Färbung entfernt. Die Migration wurde indirekt bestimmt, indem die Membran nach der Färbung photographiert und die Intensität der einzelnen Spots mit Hilfe des Programmes SynSnap (Syngene) bestimmt wurde. Die Transmigration wird als Verhältnis der Messwerte stimulierter zu unstimulierter Zellen in Form eines Indexwertes (Migrationsindex) dargestellt.

RpmI-PufferI: 0,5 % BSA in RPMI 1640; 8 mM HEPES pH 7,4

4.11 MAPK-Assay

Um vorgeschaltete Signalmoleküle in der Aktivierung des Elk-1 Transkriptionsfaktors im MAPK-Signalweg zu bestimmen, wurden Zellen mit Rezeptoren, mit chimären Transkriptionsfaktoren (Elk1-GAL4) und einem Luziferase-Gen (Promotor mit GAL4-Motiven) kotransfiziert und dann unter gleichzeitiger Zugabe von spezifischen Inhibitoren stimuliert. Für die Detektion der Elk-1-abhängigen Transkription wurde das *”PathDetect in vivo signal transduction pathway reporting system”* (Stratagene) und das *”Dual-Luziferase reporter assay system”* (Promega) verwendet. Die Aktivierungsdomäne des chimären Transkriptionsfaktors ist so gewählt, daß sie spezifisch über eine Kinase-Kaskade aktiviert werden. Die Messung der Luziferase-Aktivität in den Zellen erfolgt mit Hilfe eines Luminometers. Als interne Kontrolle für Variationen in den Versuchsbedingungen (Zellzahl, Transfektionseffizienz u. a. Faktoren) wird eine weitere Luziferase unter der Kontrolle eines Thymidinkinase-Promotors kotransfiziert. Die Aktivitäten der beiden unterschiedlichen Luziferasen können unabhängig voneinander bestimmt werden.

Es wurden verschiedene Kombinationen von Plasmiden transfiziert, wobei die Gesamtmenge der transfizierten DNA pro Loch konstant blieb. Als Medium wurde DMEM unter Zusatz von lediglich 5 % FKS verwendet.

CHO-K1-Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in 6-Loch-Zellkulturplatten ausgesät, so daß sie zum Zeitpunkt der Transfektion etwa 70 % konfluent waren. In der folgenden Übersicht ist die Menge der DNA für die einzelnen Plasmide, mit denen die Zellen eines ›wells‹ transfiziert wurden, aufgelistet:

Plasmide	CHO-K1-Zellen	Suspensionszellen
pFR-Luc	0.5 µg	5 µg
pFA-Elk1	0.05 µg	1 µg
pFC-MEK1	0.05 µg	1 µg
pRL-TK	0.125 µg	4µg
Plasmid mit cDNA oder Mock-Plasmid	0,1 µg	20 µg

Die Transfektion erfolgt in CHO-K1-Zellen durch Kalziumphosphat-Präzipitation oder bei Suspensionszellen durch Elektroporation. 24 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium gegen serumfreies Medium ausgetauscht, und die Zellen für 1 h im CO₂-Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Bei der Verwendung von Inhibitoren für Proteinkinasen oder Pertussis-Toxin wurden diese im Verlauf dieser Inkubationszeit zugegeben. Die Zellen wurden durch Zugabe eines Liganden stimuliert und für weitere 6 h im CO₂-Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Im Anschluß wurden die Zellen in 300 µl des Lysis-Puffers pro Loch 30 min bei RT lysiert. Es wurden jeweils 20 µl des Lysats und je 50 µl der Reagenzien I und II des ›Dualen Reporter-Assay‹-Kits pro Messung verwendet. Reagenz I ermöglicht die Messung

der Aktivität der *firefly*-Luziferase (RLU1), während Reagenz 2 dieses Signal unterdrückt, dafür aber die Messung der Aktivität der *Renilla*-Luziferase (RLU2) erlaubt.

4.12 Orthotope Applikation von MDA-MB435S1-Zellen

Um die Bedeutung von CCR7 in Abhängigkeit von der Stimulation mit CCL19 und CCL21 im Prozeß der Metastasierung *in vivo* zu untersuchen, wurde ein Mausmodell verwendet, in dem stabil exprimierende humane Mammakarzinomzellen orthotopisch im Mammafettgewebe von Nacktmäusen zu einem Primärtumor heranwuchsen. Eine Besonderheit der humanen Mammakarzinomzellen MDA-MB435S1 ist, daß sie aufgrund der Expressionsprofile verschiedener Gene viele Ähnlichkeiten zu Melanomzellen besitzen (Ross et al., 2000; Scherf et al., 2000). Die *in vitro* gewachsenen Tumorzellen wurden trypsiniert, mit PBS gewaschen und pelletiert. Nach Resuspendierung in PBS wurde die Zellkonzentration mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Vitalität der Zellen mit Trypanblau geprüft. Es wurden 10^6 Zellen in das Mammafettgewebe von Nacktmäusen appliziert. Im 1. Experiment wurden verschiedene Zelllinien (siehe Tabelle 1) jeweils 5 Tieren in das Mammafettpolster appliziert. Die Tiere wurden nach Erreichen einer Tumorgröße von mindestens 15 mm Länge (maximal 20 mm) hinsichtlich der Metastasenbildung in verschiedenen Organen analysiert. Im 2. Experiment wurden die in Tabelle 1 aufgelisteten Zelllinien ebenfalls in jeweils 10 Mäusen orthotop appliziert. Es zeigte sich jedoch, daß nach 4 Monaten nur vereinzelt Tumore angewachsen waren, so daß die Primärtumore operativ herausgenommen, aufgeteilt, und wieder in neue Nacktmäuse (je 6 Tiere) retransplantiert wurden. Dies sollte ein besseres Anwachsen des Tumors garantieren, was sich auch bestätigte. Bei Erreichen einer Tumorgröße von mindestens 15 mm Länge (maximal 20 mm) wurden die Tiere wie im 1. Experiment analysiert.

In den beiden Experimenten wurden 10^6 Zellen in Kooperation mit Dr. Fichtner ins Mammafettgewebe von 6-8 Wochen alten weiblichen athymischen Nacktmäusen (NMR-nu, Borchholdt Gard Breeding and Research Center, Dänemark) appliziert. Dazu wurden die Mäuse unter SPF-Bedingungen (*specific pathogen free*) gehalten, mit Radenarkon (40 mg/kg, Arzneimittelwerk, Dresden) betäubt, ein 5 mm langer Schnitt oberhalb der oberen abdominalen Brustdrüse gemacht und eine 30 µl Zellsuspension in PBS ins Mammafettpolster injiziert. Die Wunden wurden mit Wundklammern verschlossen, die nach einer Woche entfernt wurden. Der Tumor wurde einmal pro Woche mit einem Greifzirkel gemessen. Das Tumolvolumen wurde gemäß der Formel Länge x Breite x Breite/ 2 errechnet (Geran et al., 1977). Die Tiere wurden dann entsprechend dem deutschen Tierschutzgesetz bei einer Tumorgröße von mindestens 15 (maximal 20 mm) in Länge getötet, und daraufhin wurde die Bildung von Metastasen in der Lunge und in anderen Organen untersucht (Tabelle 1).

Primärtumor und Metastasen werden auf Expression von CCR7, CD155, CXCR3, HLA-ABC und den Liganden humane CCL19 und CCL21 hin analysiert. Bei der Autopsie wurden die Organe auf die Bildung von Metastasen hin untersucht. Der Primärtumor, die axillären,

inguinalen und mesenterialen Lymphknoten, Lunge, Leber, Milz und Niere wurden zur Expressionsanalyse zur Hälfte in Flüssigstickstoff für Gefrierschnitte schockgefroren; die andere Hälfte der Organe wurde in PBS zerkleinert, die Zellen vereinzelt und in der FACS-Analyse ausgewertet.

Tabelle 1: Versuchsaufbau des Metastasierungsmodells und zeitliche Übersicht über den experimentellen Verlauf in den Nacktmäusen.

	1. Experiment		2. Experiment	
applizierte Tumorzellen	Versuchstiere mit Primärtumor	Versuchsdauer	Versuchstiere mit Primärtumor	Versuchsdauer nach Replantation
MDA-MB435S1			n=5	5-6 Monate
CCR7 Klon 1	n=3	6 Monate	n=4	3-4 Monate
CCR7-pZeo Pool			n=6	1-2 Monate
CCR7-CCL19 Klon 1			n=4	2-5 Monate
CCR7-CCL19 Klon 2			n=4	2-3 Monate
CCR7-CCL19 Pool	n=4	6 Monate	n=2	4 Monate
CCR7-CCL21 Klon 1	n=4	4 Monate	n=6	1-2 Monate
CCR7-CCL21 Klon 2			n=4	5-6 Monate
CCR7-CCL21 Pool			n=6	2-4 Monate

4.13 Kurzzeitmigrationsexperiment

Nachdem Splenozyten aus dem Spendertier isoliert bzw. MDA-MB435S1-Zellen suspendiert worden waren, wurden diese mit CFSE für 30 min markiert und anschließend mit oder ohne 100 nM FTY720 für 30 min bei 37 °C *ex vivo* inkubiert. Des weiteren wurden die Zellen in PBS aufgenommen; bei MDA-MB435S1-Zellen mußte 2 mM EDTA zugegeben werden, damit die Zellen nicht im Spritzkolben bereits koagulierten. Für das Experiment mit Wildtyp (BALB/c)- und CCR7^{-/-}(gemischter Hintergrund von BALB/c und SV129/EV)-Splenozyten wurden 10⁷ Zellen eingesetzt, bei MDA-MB435S1-Zellen 4x 10⁶ Zellen. Die zu untersuchenden Mäuse (BALB/c) wurden für die FTY720-Experimente über Nacht ohne

Futter gehalten. Am nächsten Morgen wurde den FTY720-behandelten Mäusen oral 0,3 mg FTY720 pro kg Mausgewicht (0,3 mg/ kg) gelöst in 100 µl Wasser verabreicht. Kontrolltieren wurde stattdessen 100 µl Wasser verabreicht. 3 Stunden nach Injektion in die Schwanzvene der Maus wurde das Tier getötet und die zu untersuchenden Organe werden entnommen. Um die Zellzahl der unterschiedlichen Organe zu bestimmen, wurden die suspendierten Zellen der jeweiligen Organe oder Blut in gleichen Volumen aufgenommen und in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Der Prozentanteil injizierter Zellen wurde per FACS (480 nm) über die Fluoreszenz der CFSE-markierten Zellen ermittelt.

4.13.1 Berechnung des relativen Populationsanteils von CFSE-markierten Splenozyten in den Organen

- 1) In den verschiedenen Organen und dem Blut wird im FACS der prozentuale Anteil CFSE-markierter Splenozyten aus dem Verhältnis von CFSE-markierten Zellen pro 10.000 Leukozyten (im FACS gezählt) ermittelt.
- 2) Die Organsuspension wurden in einem konstanten Volumen Puffer aufgenommen, und die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die bei der Zählung erhaltenen Zellzahlen wurden mit dem prozentualen Anteil CFSE-markierter Zellen, die für dieses Organ bestimmt wurden, multipliziert. Die so erhaltenen Werte für FTY720-behandelte Tiere wurde nun in Verhältnis zu den entsprechenden Werten der Kontrolltiere gesetzt. Die Standardabweichung errechnet sich aus den Ergebnissen vom 2 unabhängigen Experimenten mit jeweils mindestens drei Tieren.

4.13.2 Berechnung des relativen Populationsanteils von CFSE-markierten Tumorzellen

- 1) In den verschiedenen Organen wurde im FACS der prozentuale Anteil CFSE-markierter Tumorzellen aus dem Verhältnis von CFSE-markierten Zellen pro 10.000 Zellen (im FACS gezählt) ermittelt. Die Organe wurden dabei immer in 4 ml Probenvolumen aufgenommen.

4.14 FTY720-Versuche

4.14.1 Kurzzeit-Depletion und -Infiltration von Lymphozyten in der Maus nach oraler Injektion von FTY720

Um die Wirkung der immunmodulatorischen Substanz FTY720 auf Lymphozyten in Wildtyp- und *knockout*-Mäusen zu untersuchen, wurde den Tieren oral FTY20 verabreicht und die Tiere nach 6 Stunden Inkubation hinsichtlich des Migrationsverhaltens analysiert. Die zu untersuchenden Mäuse wurden dafür über Nacht ohne Futter gehalten. Am nächsten Morgen wurde den FTY720-behandelten Mäusen oral 0,3 mg FTY720 pro kg Mausgewicht (0,3 mg/ kg) gelöst in 100 µl Wasser (FTY720-behandelte Tiere) bzw. 100 µl Wasser ohne Zugabe von FTY720 (Kontrolltiere) verabreicht. 6 Stunden nach Inkubation wurden die Tiere mit Ether getötet, Blut aus dem Herzen oder retroorbital entnommen und ebenso wie die zu

untersuchenden Organe. Die Organe wurden aufgearbeitet, indem sie durch ein Sieb gerieben, weiter durch eine Gaze gespritzt und anschließend in PBS aufgenommen wurden. Die Leukozytenkonzentration der Suspension wurde in der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Der Rest der Zellsuspension wurde mit passendem Serum blockiert und dann weiter mit gewünschten Antikörpern inkubiert. Am Ende der Färbung wurden die Zellen in PBS aufgenommen, und der spezifische Anteil von Zellpopulationen wurde aus 10.000 im FACS gemessenen Events ermittelt.

4.14.2 Berechnung der Populationsanteile in den Organen

Aus den Prozentzahlen der Zellpopulation von FTY720-behandelten Tieren im Organ oder Blut lassen sich drei Werte ableiten:

- 1) Bestimmung der relativen Zellzahl (bei Verwendung eines konstanten Volumens für die Organsuspensionen) aus verschiedenen Organen und der Konzentration an Leukozyten im Blut nach Behandlung mit FTY720 oder Puffer (Wasser).
- 2) Bestimmung der relativen Anteile verschiedener Zellpopulationen, berechnet aus 10.000 Events nach Anwendung eines *Gates* in der FACS-Analyse.
- 3) Prozentanteil einer Lymphozytenpopulation (aus 2) wurde multipliziert mit der relativen Zellzahl (aus 1) der jeweiligen Organe oder der Konzentration der Leukozyten im Blut.
- 4) Die relative Zahl (aus 3) von Puffer-behandelten Tieren (Kontrolltieren) wurde gleich 1 gesetzt. Die relative Zahl (aus 3) von FTY720-behandelten und den Puffer-behandelten Tieren wurde miteinander ins Verhältnis gesetzt und dargestellt.