

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 MATERIAL

3.1.1 ZELLKULTUR

Zellkultur-Medien:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (BioWhittaker, Apen)
	Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM) ohne Methionin und Glutamin (BioWhittaker, Apen)
Seren:	Fetales Kälberserum (FKS) (BioWhittaker, Apen)
Sonstige Reagenzien:	Trypsin / EDTA (BioWhittaker, Apen)
	Penicillin (100 U/ml) / Streptomycin (100 µg/ml) (BioWhittaker, Apen)
	Lipofektin-Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe)
	L-Glutamin-Lösung (BioWhittaker, Apen)
	Protein A-Sepharose-Beads (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)
	Bovines Serumalbumin (BSA) (Sigma, Deisenhofen)
Zellkultur-Gefäße:	Kulturschalen und Flaschen, oberflächenbehandelt, gammasterilisiert (Greiner, Frickenhausen)
	Zentrifugenröhrchen (Greiner, Frickenhausen)
	Zellschaber, gammasterilisiert (Greiner, Frickenhausen)

3.1.2 ZELL-LINIEN, GENE, ANTISEREN, BAKTERIEN, VIREN

Zell-Linien:	CV1	Nierenzell-Linie aus der Afrikanischen Grünen Meerkatze
Gene:	F _{Wt}	Gen des Fusionsproteins des Sendai-Virus, Strain Z, einkloniert in das Plasmid pTM1
	F _{Cys}	Gen des Fusionsproteins des Sendai-Virus, Strain Z, Aminosäure Serin an Position 7 der Cytoplasmatischen Domäne gegen Cystein getauscht, einkloniert in pTM1 (Dr. Ponimaskin, Berlin)
	HA'	Gen des Hämagglutinins des Influenzavirus A, Subtyp H7, einkloniert in pTM1
	CD4	Gen des CD4-Rezeptorproteins, einkloniert in pTM1
	CD8	Gen des CD8β-Rezeptorproteins, einkloniert in pTM1

Antisera:	RPJM	polyklonales Anti-Sendaivirus-Serum aus dem Kaninchen
	Anti-IgG	Anti-Kaninchen-IgG aus dem Schaf, FITC-konjugiert
Bakterien:	XL1-Blue	Epicurian Coli XL1-Blue Competent Cells (Stratagene, Amsterdam, Niederlande)
Viren:	vTF7-3	rekombinantes Vaccinia-Virus mit Gen für die RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7

3.1.3 ISOTOPE UND OLIGONUKLEOTIDE

Isotope:	³⁵ S-Met	Trans- ³⁵ S-label (³⁵ S-Methionin) (ICN, Irvine, USA)
	³ H-Pal	n-9,10- ³ H-Palmitinsäure (NEN DuPont, Boston, USA)
		α-[³⁵ S]-dATP (ICN, Irvine, USA)
Oligonukleotide:		Oligonukleotid-Primer für PCR und Sequenzierungen (Invitek, Berlin)

3.1.4 ENZYME

Restriktionsenzyme:	EcoN I (New England Biolabs, Schwalbach)
	Xho I (New England Biolabs, Schwalbach)
	Pst I (New England Biolabs, Schwalbach)
	BamH I (New England Biolabs, Schwalbach)
Glykosidasen:	Endoglykosidase H (EndoH) (New England Biolabs, Schwalbach)
	Peptid-N-Glykosidase F (PNGaseF) (New England Biolabs, Schwalbach)
Sonstige Enzyme:	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) (New England Biolabs, Schwalbach)
	T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, Schwalbach)
	Lysozym (Serva, Heidelberg)
	DNase (Boehringer, Mannheim)
	RNAse A (Boehringer, Mannheim)

3.1.5 KITS

DNA-Aufreinigung:	JetSorb Gel Extraction Kit (Genomed, Bad Oeynhausen)
	High Pure PCR Product Purification Kit (Boehringer, Mannheim)
	Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden)
DNA-Sequenzierung:	T7 Sequencing™ Kit (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)

3.1.6 WEITERE REAGENZIEN

Elektrophoresen:	Agarose (Roth, Karlsruhe)
	Ethidiumbromid (Sigma, Deisenhofen)
	Rotiphorese (Roth, Karlsruhe)
	Acrylamid (Roth, Karlsruhe)
	Bisacrylamid (Roth, Karlsruhe)
	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) (Roth, Karlsruhe)
	Natriumdodecylsulfat (SDS) (Serva, Heidelberg)
	Tetramethylethylenediamine (TEMED) (BioRad, München)
	Ammoniumpersulfat (APS) (Sigma, Deisenhofen)
	Lambda-Marker (New England Biolabs)
	Proteinmarker prestained (Gibco BRL, Berlin)
Agar und Medien:	Select Agar (Gibco BRL, Berlin)
	2-YT-Bouillon (Gibco BRL, Berlin)
	Hefe Extrakt (Gibco BRL, Berlin)
	Trypton (Gibco BRL, Berlin)
	Pepton (Gibco BRL, Berlin)
PCR-Reagenzien:	InviTaq DNA Polymerase (Invitex, Berlin)
	dNTP-Mix (Invitex, Berlin)

Die verwendeten Lösungsmittel, Säuren und Basen wie auch verwendete Salze und alle nicht erwähnten Chemikalien stammen von der Firma Roth, Karlsruhe.

3.1.7 GERÄTE

Agarose-Gelelektrophorese:	Agagel Mini (Biometra, Göttingen)
SDS-Gelelektrophorese:	Minigel / Maxigel (Biometra, Göttingen)
DNA-Sequenzierung:	Life Technologies
Fluoreszenz-Mikroskop:	Axioskop (Zeiss, Jena)
Zentrifugen:	Tischzentrifuge (Eppendorf)
	Laborzentrifuge BioLine (Heraeus)
	Ultrazentrifuge L7-65 mit Rotor Ti 45 (Beckmann Coulter)
	Vacuumzentrifuge Univapo 150H (UniEquip)
UV-Spektrometer:	Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)

Thermocycler:	Perkin Elmer, USA
Durchflusszytometer:	EPICS XL (Beckmann Coulter)

3.1.8 DOKUMENTATION

Gel-Dokumentation	Videokamera Kappa CF 8/1 RCC mit Objektiv Cosimcar / Pentax TV Lens 16mm 1:1.4 und Software Image P2 Version 8.2 (H&K Meßsysteme, Berlin)
Scanner	Flachbettscanner GT-7000 (Epson)
Filme	Kodak Röntgenfilme X-OMAT AR (Sigma, Deisenhofen)
Software	Bildbearbeitungssoftware Photoshop Version 5.5 (Adobe) Densitometrie-Software Gel Pro Analyzer 9.0 Software (Media Cybernetics, Gleichen)

3.2 METHODEN

3.2.1 ERSTELLUNG VON CHIMÄREN UND MUTANTEN

3.2.1.1 Overlap Extension PCR

Um den Einfluss der Transmembranregion oder den Effekt einzelner Aminosäuren herauszufinden, wurden Chimären aus palmitoylierten und nicht palmitoylierbaren Proteinen und Mutanten mit gezielt ausgetauschten Aminosäuren hergestellt. Sowohl für die Erstellung der Gen-Chimären als auch für die gezielte Mutagenese wurde die Technik der Overlap Extension-PCR verwendet [Ge und Rudolph, 1997; Urban et al., 1997; Lorenzo und Blasco, 1998; Mehta und Singh, 1999]. Hierbei wurden in einer ersten PCR-Runde zunächst kleinere Segmente der DNA-Templates erstellt, wobei die inneren Oligonukleotid-Primer zueinander komplementäre überhängende Enden enthielten, so dass die Amplifikate selbst in einer weiteren PCR als Primer dienen konnten. Nach Aufreinigung der beiden Amplifikate aus einem Agarosegel (siehe 3.2.1.2 und 3.2.1.3) wurden in der zweiten PCR-Runde nur die beiden Außenprimer sowie beide Fragmente der ersten PCR als Template eingesetzt (Abb. 8). Zur Erstellung der Mutationen wurde ein ähnliches Prinzip genutzt, wobei die Punktmutationen hier im Bereich der zueinander komplementären Innen-Primer vorlagen (Abb. 9). Für die PCR-Reaktionen wurden jeweils 200 – 500 ng des DNA-Templates, 0,1 – 1 µM von jedem Primer, 2,5 µM von jedem Nukleotid und 1,5 – 2,5 IU *Taq*-Polymerase in einem 100 µl-Ansatz eingesetzt. Im Thermocycler-Profil folgten nach der initialen Denaturierung bei 94 °C für 10 min 35 Zyklen, jeweils mit 1 min Denaturierung bei 94 °C,

30 s Primer-Anlagerung (Annealing) bei Temperaturen zwischen 50 und 56 °C und 1 min Kettenverlängerung (Elongation) bei 72 °C, gefolgt von der finalen Verlängerung für 10 min bei 72 °C. Die Primer wurden so erstellt, dass die betreffenden Primerpaare jeweils ähnliche Schmelztemperaturen aufwiesen und die Überlappungsregion in etwa der Länge des DNA-bindenden Primer-Stücks entsprach. Die für eine optimale PCR-Effizienz entscheidende Wahl der Annealing-Temperatur (T_{Ann}) wurde aus dem G/C-Gehalt der jeweiligen Primer mit der Formel [$T_{Ann} = 0,41 \times (\%GC) + 34,9^{\circ}C$] berechnet. Übersichtsdarstellungen über die verwendeten Primer und die als Template verwendeten Gene finden sich in den *Tabellen 7* und *8*. Nach beiden PCR-Runden lag das komplette mutierte Gen bzw. die Gen-Chimäre mit den flankierenden Restriktionsenzym-Schnittstellen für EcoN I und Xho I oder für Pst I als Amplifikat vor und konnte aus dem Agarosegel aufgereinigt werden (siehe 3.2.1.2 und 3.2.1.3). Die aufgereinigten Fragmente wurden im Folgenden wieder in den Vektor pTM1 inkloniert.

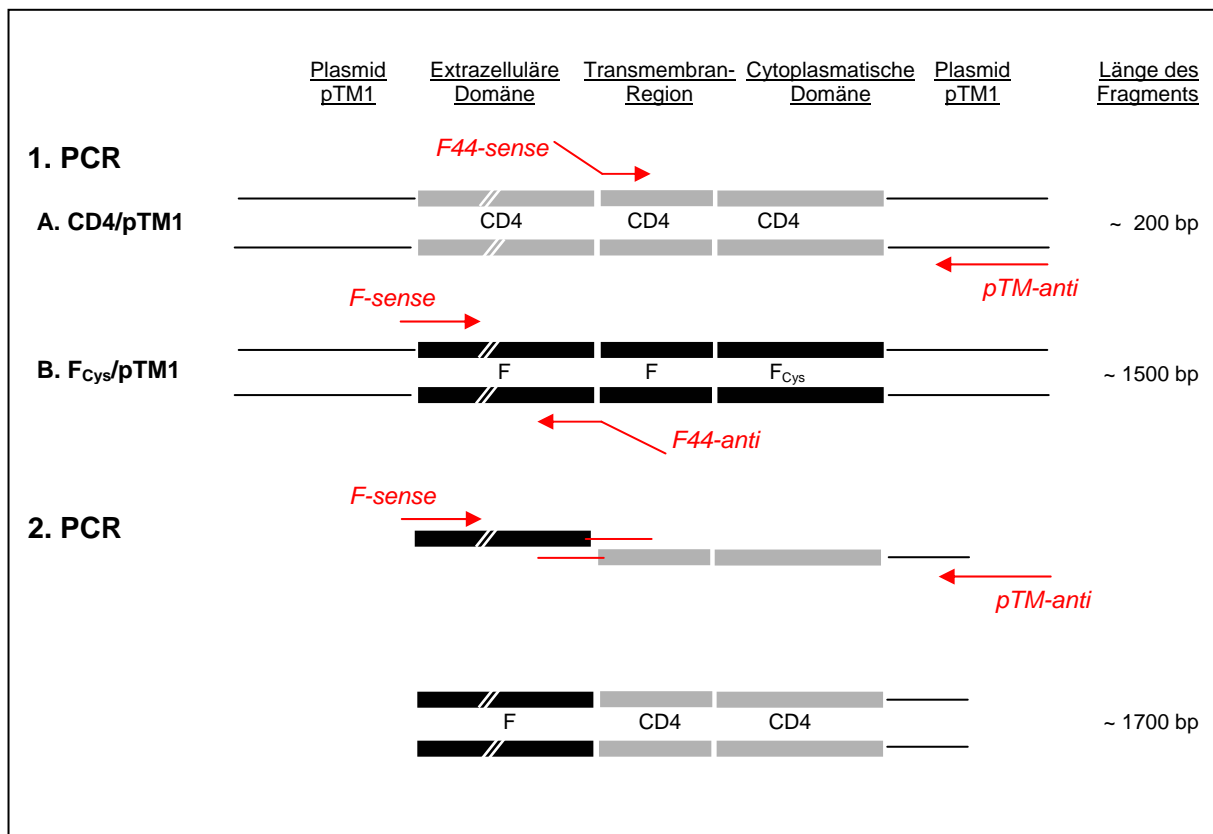


Abb. 8: **Prinzip der Chimären-Erstellung mittels Overlap Extension-PCR** am Beispiel einer Chimäre aus der extrazellulären Domäne des Fusionsproteins des Sendaivirus (F) und der Transmembranregion und der cytoplasmatischen Domäne des CD4-Rezeptorproteins (CD4). Die Primer *F-sense* und *pTM-anti* dienen als Außenprimer, *F44-sense* und *F44-anti* waren die Innenprimer und wiesen zueinander komplementäre Enden auf.

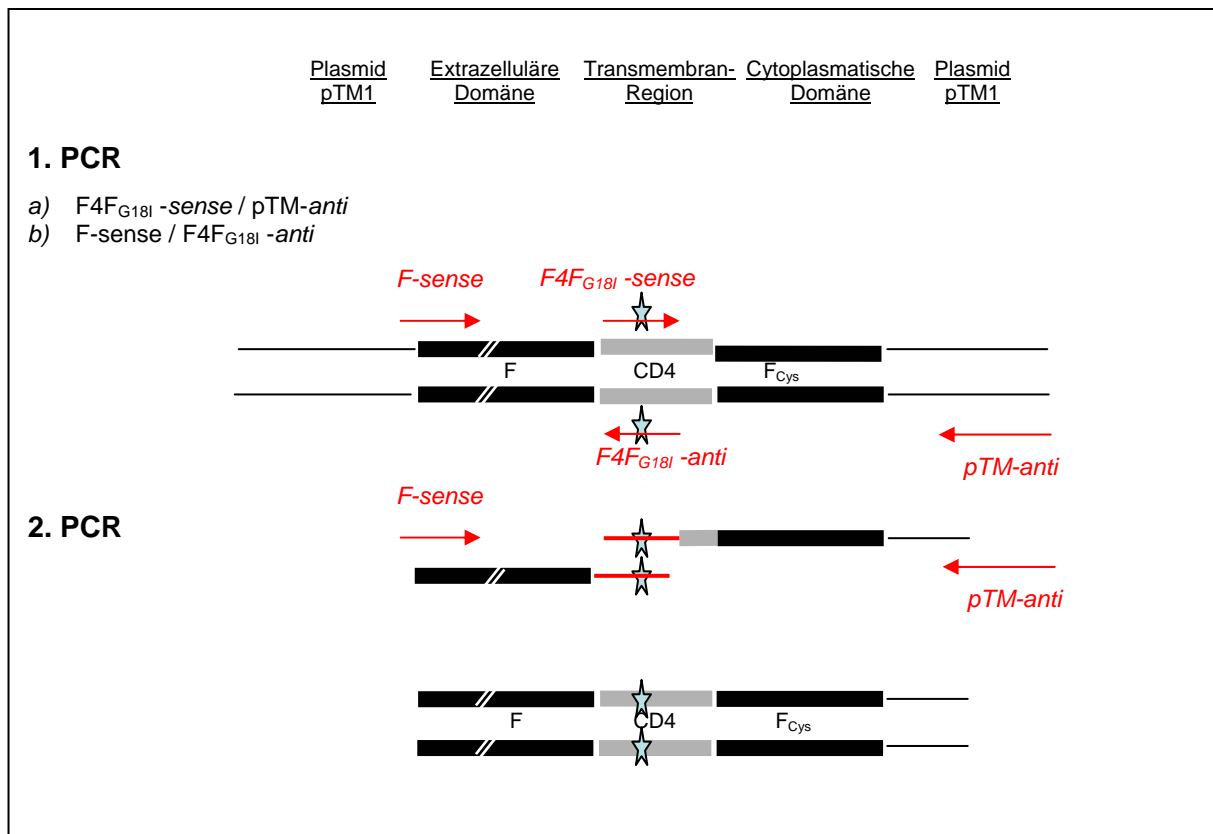


Abb. 9: **Prinzip der Erstellung von Mutanten mittels Overlap Extension-PCR** am Beispiel der Erstellung der Mutante mit ausgetauschtem Glycin gegen Isoleucin an Position 18 in der Transmembranregion der Chimäre F-CD4-F_{Cys} aus der extrazellulären und cytoplasmatischen Domäne des Fusionsproteins des Sendaivirus (F) und der Transmembranregion des CD4-Rezeptorproteins (CD4). Die Primer *F-sense* und *pTM-anti* dienen als Außenprimer, *F4F_{G18I}-sense* und *F4F_{G18I}-anti* waren die Innenprimer und enthielten die Mutationen (gekennzeichnet durch Sterne).

3.2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die aus den PCR-Reaktionen resultierenden spezifischen Fragmente wurden über ein Agarosegel aufgetrennt, wobei zunächst Stop-Puffer im Verhältnis 1:6 zum Restriktionansatz gegeben wurde. Diese Ansätze wurden zusammen mit einem Größenstandard (Lambda-Marker) auf ein 1%-iges Agarosegel in TAE-Puffer mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zur Detektion aufgetragen und in eine horizontale Elektrophoresekammer verbracht. Bei der Elektrophorese kommt es durch die Anlegung einer elektrischen Spannung von 80 Volt für 45 Minuten zu einer Wanderung der negativ geladenen Nukleinsäure-Fragmente zum positiven Pol, wobei es zu einer Auftrennung der Fragmente nach ihrer Größe kommt. Einzelne Ethidiumbromid-Moleküle interkalieren dabei zwischen die Basen der DNA, wodurch sich das Anregungsspektrum von Ethidiumbromid verändert und so die Fluoreszenz der Substanz bei Anregung durch ultraviolettes Licht (302 nm) stark erhöht wird. Auf diese Weise leuchten im Agarosegel die Stellen, an denen sich Nukleinsäuren befinden, unter UV-

Licht hell auf, während Stellen ohne Nukleinsäuren dunkel erscheinen, wobei die Lichtintensität proportional zur vorhandenen DNA-Menge ist.

Tab. 7: Primer-Sequenzen für die ortsgerichtete Mutagenese per Overlap-Extension PCR.

Primer	Oligonukleotid-Sequenz (5' – 3')	Annealing-Temperatur T _{Ann} [°C]
F-sense	ATG ACA GCA TAT ATC CAG AGA	50
pTM-anti	TTA GGC CTC TCG AGC TGC AG	60
F44- sense	GGT ACA ACT CAA GAG AGA CTG CCC TGA TTG TGC	56
F44- anti	GCC CCC CAG CAC AAT CAG GGC AGT CTC TCT TGA TTG	59
F88- sense	GGT ACA ACT CAA GAG AGA CTT TGG CCG GGA CTT G	55
F88- anti	CCC CAC AAG TCC CGG CCA AAG TCT CTC TTG ATT G	58
F4F- sense	GGC ATC TTC TTC TCT GTC AGA CTC AGA AGG TG	55
F4F- anti	GCA TAC ACC TTC TGA GTC TGA CAG AGA AGA AG	54
F8F- sense	CAC CCT TTA CTC CAA CCA CAG ACT CAG AAG GTG	56
F8F- anti	GCA TAC ACC TTC TGA GTC TGT GGT TGG AGT AAA G	54
FHF- sense	GCC TTG TTT TCA TAT CTG TGA GAC TCA GAA GG	53
FHF- anti	GCA TAC ACC TTC TGA GTC TCA CAG ATA TGA AAA C	52
F4F-T- sense	PCA TTG GGC TAG GCA TCT TCT TCT CTG TCA G	55
F4F-T- anti	CAG AGA AGA AGA TGC CTA GCC C	57
F4F-GT- sense	PGC TTT TCA TTG GGC TAA TCA TCT TCT TCT CTG TCA GAC	52
F4F-GT- anti	CTG ACA GAG AAG AAG ATG ATT AGC CCA ATG AAA AG	51
F4F-GGT- sense	PGC CTC CTG CTT TTC ATT ATC CTA ATC ATC TTC TTC TCT GTC	51
F4F-GGT- anti	GAC AGA GAA GAA GAT GAT TAG GAT AAT GAA AAG CAG G	50
FHF-G- sense	CAT TGC AAT GGT CTT GGT GTT C	53
FHF-G- anti	GAA CAC CAA GAC CAT TGC AAT G	53
FHF-FG- sense	CAT TGC AAT GGT CTT GGT GAT CAT TAT AGT G	50
FHF-FG- anti	CAC TAT AAT GAT CAC CAA GAC CAT TGC AAT G	50
FHF-C11- sense	GCA TCA ATC TCT TTG CTT CTT GCC	53
FHF-C11- anti	GGC AAG AAG CAA AGA GAT TGA TGC	52
FHF-F23- sense	ATG GGC TTG GTG ATC ATT ATA GTG	52
FHF-F23- anti	CAC TAT AAT GAT CAC CAA GCC CAT	52
FHF-G8- sense	AGC TTC GTG GCA TCA TGC TCT TTG	55
FHF-G8- anti	CAA AGA GCA TGA TGC CAC GAA GCT	55
FHF-FF57- sense	ATA CTT TGG ATT AGC ATC GGG GCA	52
FHF-FF57- anti	TGC CCC GAT GCT AAT CCA AAG TAT	53

Tab. 8: Primer und DNA-Templates zur Erstellung der Chimären und Mutanten.

Chimäre oder Mutante	Innenprimer	Außenprimer	DNA-Templates
F-CD4-CD4	F44- <i>sense</i> F44- <i>anti</i>	F- <i>sense</i> pTM- <i>anti</i>	F _{Wt} in pTM1 CD4 in pTM1
F-CD4-F _{Cys}	F4F- <i>sense</i> F4F- <i>anti</i>	F- <i>sense</i> pTM- <i>anti</i>	F _{Cys} in pTM1 F-CD4-CD4 in pTM1
F-CD8-CD8	F88- <i>sense</i> F88- <i>anti</i>	F- <i>sense</i> pTM- <i>anti</i>	F _{Wt} in pTM1 CD8 in pTM1
F-CD8-F _{Cys}	F8F- <i>sense</i> F8F- <i>anti</i>	F- <i>sense</i> pTM- <i>anti</i>	F _{Cys} in pTM1 F-CD8-CD8 in pTM1
F-HA-HA	FHH- <i>sense</i> FHH- <i>anti</i>	F- <i>sense</i> pTM- <i>anti</i>	F _{Wt} in pTM1 HA in pTM1
F-HA-F _{Cys}	FHF- <i>sense</i> FHF- <i>anti</i>	F- <i>sense</i> pTM- <i>anti</i>	F _{Cys} in pTM1 F-HA-HA in pTM1
F-CD4-F _{Cys} G18I	F4F-GT- <i>sense</i> F4F-GT- <i>anti</i>	F- <i>sense</i> pTM- <i>anti</i>	F-CD4-F _{Cys} in pTM1
F-CD4-F _{Cys} G1618I	F4F-GGT- <i>sense</i> F4G-GGT- <i>anti</i>	F- <i>sense</i> pTM- <i>anti</i>	F-CD4-F _{Cys} in pTM1
F-HA-F _{Cys} G20V	FHF-G- <i>sense</i> FHF-G- <i>anti</i>	F- <i>sense</i> pTM- <i>anti</i>	F-HA-F _{Cys} in pTM1
F-HA-F _{Cys} G20VF23I	FHF-FG- <i>sense</i> FHF-FG- <i>anti</i>	F- <i>sense</i> pTM- <i>anti</i>	F-HA-F _{Cys} in pTM1
F-HA-F _{Cys} C11I	FHF-C11- <i>sense</i> FHF-C11- <i>anti</i>	F- <i>sense</i> pTM- <i>anti</i>	F-HA-F _{Cys} in pTM1
F-HA-F _{Cys} F23I	FHF-F23- <i>sense</i> FHF-F23- <i>anti</i>	F- <i>sense</i> pTM- <i>anti</i>	F-HA-F _{Cys} in pTM1
F-HA-F _{Cys} G08V	FHF-G8- <i>sense</i> FHF-G8- <i>anti</i>	F- <i>sense</i> pTM- <i>anti</i>	F-HA-F _{Cys} in pTM1
F-HA-F _{Cys} G0820V	FHF-G8- <i>sense</i> FHF-G8- <i>anti</i>	F- <i>sense</i> pTM- <i>anti</i>	F-HA-F _{Cys} G20V in pTM1

3.2.1.3 Isolierung und Aufreinigung der DNA

Die Aufreinigung der im Agarosegel aufgetrennten spezifischen DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe des kommerziell erhältlichen Gel-Extraktionskits Jetsorb der Firma Genomed gemäß den Angaben des Herstellers. Hierzu wurden die interessierenden Banden mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und durch Zugabe von Natriumchlorat-Puffer bei 50°C für 15 min geschmolzen. Die DNA wurde unter hohen Salzkonzentrationen an eine Silica-Matrix gebunden, durch mehrfaches Waschen von der flüssigen Agarose getrennt und schließlich in TE-Puffer bei 50°C von der Matrix eluiert. Da im Eluat zurückbleibende Silica-Beads nachfolgende PCR-Reaktionen hemmen können, wurde eine weitere Reinigung nachgeschaltet, wozu das High Pure PCR Product Purification Kit (Boehringer, Mannheim) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet wurde.

3.2.2 KLONIERUNG

Die Basis-Methoden der Genetik wurden entsprechend Sambrook et al., 1989 durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden über die Restriktionsschnittstellen in das Plasmid pTM1 inkloniert und das Produkt durch DNA-Sequenzierung bestätigt.

3.2.2.1 Restriktionsenzym-Verdau

Die mit der Overlap Extension-PCR erstellten Amplifikate und das zugrunde liegende Gen F_{Cys} im Plasmid pTM1 wurden jeweils entweder mit dem Restriktionsenzym Pst I oder der Enzymkombination EcoN I und Xho I verdaut, wobei jeweils 1-3 μ g DNA mit der vom Hersteller angegebenen Menge an Enzym, dem spezifischen Puffer und BSA auf ein Reaktionsvolumen von 20 μ l versetzt und eine Stunde bei 37 °C im Wasserbad inkubiert wurde. Um eine Re-Ligation der Vektoren zu verhindern, wurde das Plasmidfragment einer Behandlung mit alkalischer Phosphatase (CIP) laut Hersteller unterzogen und zwei Stunden bei 37 °C inkubiert.

3.2.2.2 Ligation

Zur Ligation der Jetsorb-aufgereinigten cDNA-Fragmente mit dem ebenfalls aufgereinigten geschnittenen Vektor-Plasmid pTM1 (siehe 3.2.1.2 und 3.2.1.3) wurde vom Phagen T4 kodierte DNA-Ligase nach Herstellerangaben verwendet, wobei Vektor und cDNA-Fragment im Verhältnis 1:5 sowie 5 IU Ligase eingesetzt wurden. Die Ligation erfolgte bei Raumtemperatur für 2 Stunden.

3.2.2.3 Kompetente Bakterienzellen

Die Herstellung kompetenter Bakterienzellen des *E.coli*-Stammes XL1 Blue erfolgte mit Hilfe der Kalziumchlorid-Methode [Mandel und Higa, 1970; Maniatis et al., 1982]. Hierbei wurden 200 ml logarithmisch wachsende XL1 Blue-Zellen bei einer optischen Dichte (OD_{660}) von 0,5 bei 660nm in LB-Medium zehn Minuten auf Eis gekühlt und aus dem Nährmedium abzentrifugiert. Nach Resuspension in 50 ml eiskalter $CaCl_2$ -Lösung und Inkubation auf Eis für 30 min wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und in 5 ml $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert. Die so behandelten Zellen wurden in Aliquots von 200 μ l kurz in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

3.2.2.4 Transformation

Jeweils 10 ml des Ligationsansatzes oder 2 ng zu transformierende Plasmid-DNA wurden mit 100 oder 200 µl der kompetenten Zellen gemischt, für 45 Minuten auf Eis inkubiert und dann für 45 Sekunden einem Hitzeschock von 42 °C ausgesetzt. Nach nochmaligem kurzem Abkühlen wurden 800 µl Wachstumsmedium (SOC-Medium) zugegeben. Durch Inkubation bei 37 °C unter Schütteln für eine Stunde bildeten die Bakterienzellen die im Plasmid kodierte Antibiotika-Resistenz, in diesem Fall Resistenz gegen Ampicillin, aus. Durch Ausplattieren des Transformationsansatzes auf einen mit Ampicillin versetzten Nährboden konnten über Nacht bei 37 °C nur diejenigen Bakterienzellen wachsen, die das transformierte Plasmid enthielten und somit Antibiotika-Resistenz besaßen.

3.2.2.5 Plasmidisolierung

Um Kulturen der transformierten Zellen zu erhalten, wurden einzelne Bakterienkolonien mit einer sterilen Pipettenspitze von den Agarplatten abgenommen und in 5 ml YT-Medium mit Ampicillin bei 37 °C unter Schütteln über Nacht inkubiert. Aus dieser Sättigungskultur wurden zur Kontrolle der Klonierung zunächst im analytischen Maßstab die Plasmide isoliert. Die hier verwendete Minipräparations-Methode hat den Vorteil, dass alle Arbeitsschritte in einem einzigen Gefäß stattfinden [Del Sal et al., 1988]. Aus der Übernacht-Kultur wurden 1,5 ml in ein Eppendorf-Gefäß zentrifugiert und die Zellen abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 200 µl STET-Puffer mit 1 mg/ml Lysozym resuspendiert, 5 min inkubiert und 45 s im kochenden Wasserbad erhitzt. Nach Abzentrifugation der Zelltrümmer und Entfernen des Pellets mit einem sterilen Zahnstocher wurden 8 µl warmes Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) zum Überstand gegeben und der Ansatz 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Resuspension des CTAB-DNA-Komplexes in 300 µl 1,2 M NaCl-Lösung wurde die DNA mit 750 µl eiskaltem Ethanol absolut präzipitiert. Die gefällte DNA wurde mit 70%-igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Pellet nach vollständiger Trocknung bei 37 °C in 40 µl TE-Puffer mit 20 µg/ml RNase A aufgenommen. Zeigte sich in der Kontrolle, dass das Plasmid das jeweilige Gen in der richtigen Orientierung enthielt, wurde eine Plasmid-Präparation im größeren Maßstab aus Übernachtskulturen in 100 µl YT-Medium durchgeführt. Hierzu wurde das kommerziell erhältliche QIAGEN Plasmid Maxi Kit nach den Angaben des Herstellers verwendet. Der zentrale Schritt in dieser Präparationsmethode ist die Reinigung der Plasmid-DNA über Anionenaustauschersäulen. Zur Konservierung wurden Glycerinstocks aus den bestätigten Kulturen angelegt und eingefroren. Nukleinsäuregehalt und Reinheit der aufgereinigten Plasmidproben wurden durch spektralphotometrische Messung der Absorption bei 260 nm

und 280 nm bestimmt. Die optische Dichte einer Nukleinsäurelösung bei 260 nm (OD_{260}) ist ein Maß für die Konzentration an Nukleotiden, wobei eine OD von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA beziehungsweise 40 µg/ml einzelsträngiger RNA entspricht. Die OD_{280} gibt Aufschluss über die Verunreinigung mit Proteinen. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen, da ansonsten keine lineare Abhängigkeit der OD_{260} zur Nukleinsäurekonzentration gegeben ist.

3.2.2.6 Kontrolle der Klonierung

Zur Überprüfung der erfolgreichen Klonierung wurde nach der Plasmidpräparation ein analytischer Restriktionsenzym-Verdau mit nachfolgender Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierzu wurden 2 µl der präparierten DNA eingesetzt und mit den entsprechenden Enzymen, Pst I beziehungsweise EndoH I und Xho I, nach den Vorschriften der Hersteller in einem Endvolumen von 10 µl verdaut. Der analytische Restriktions-Verdau fand an den Ligations-Schnittstellen statt, so dass nach dem Verdau das DNA-Fragment und das offene Plasmid getrennt vorlagen. Die Analyse der so erhaltenen DNA-Fragmente erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung im 1%-igen Agarosegel mit Ethidiumbromid bei 90 Volt für 45 Minuten und Betrachtung unter UV-Licht (302 nm).

3.2.2.7 Sequenzierung

Zur Kontrolle der Klonierung wurde abschließend eine DNA-Sequenzierung nach der Kettenabbruch-Methode nach Sanger durchgeführt [Sanger et al., 1977]. Nach der Bindung des Sequenzierungs-Primers an die denaturierte Plasmid-DNA und der Zugabe eines Gemisches aus dCTP, dGTP, dTTP und [³⁵S]-dATP wurde der DNA-Strang mit Hilfe einer DNA-Polymerase verlängert und dabei radioaktiv markiert. Nach Aufteilung der Probe auf vier Ansätze erfolgte die Kettenabbruch-Reaktion, wobei jeder Ansatz neben dem Nukleotidgemisch jeweils eines der vier 2',3'-Dideoxy-Nukleotide (ddNTP), ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP, enthielt. Diese Nukleotid-Analoga werden wie reguläre Nukleotide in den neusynthetisierten DNA-Strang eingebaut, wobei dieser allerdings wegen der fehlenden Hydroxy-Gruppe des ddNTP's nicht weiter verlängert werden kann. Als Folge kommt es zum Kettenabbruch, und DNA-Fragmente definierter Längen entstehen. Diese Fragmente werden in einem Polyacrylamid-Gel nach ihrer Größe getrennt und mittels Fluorographie sichtbar gemacht (Abb. 10).

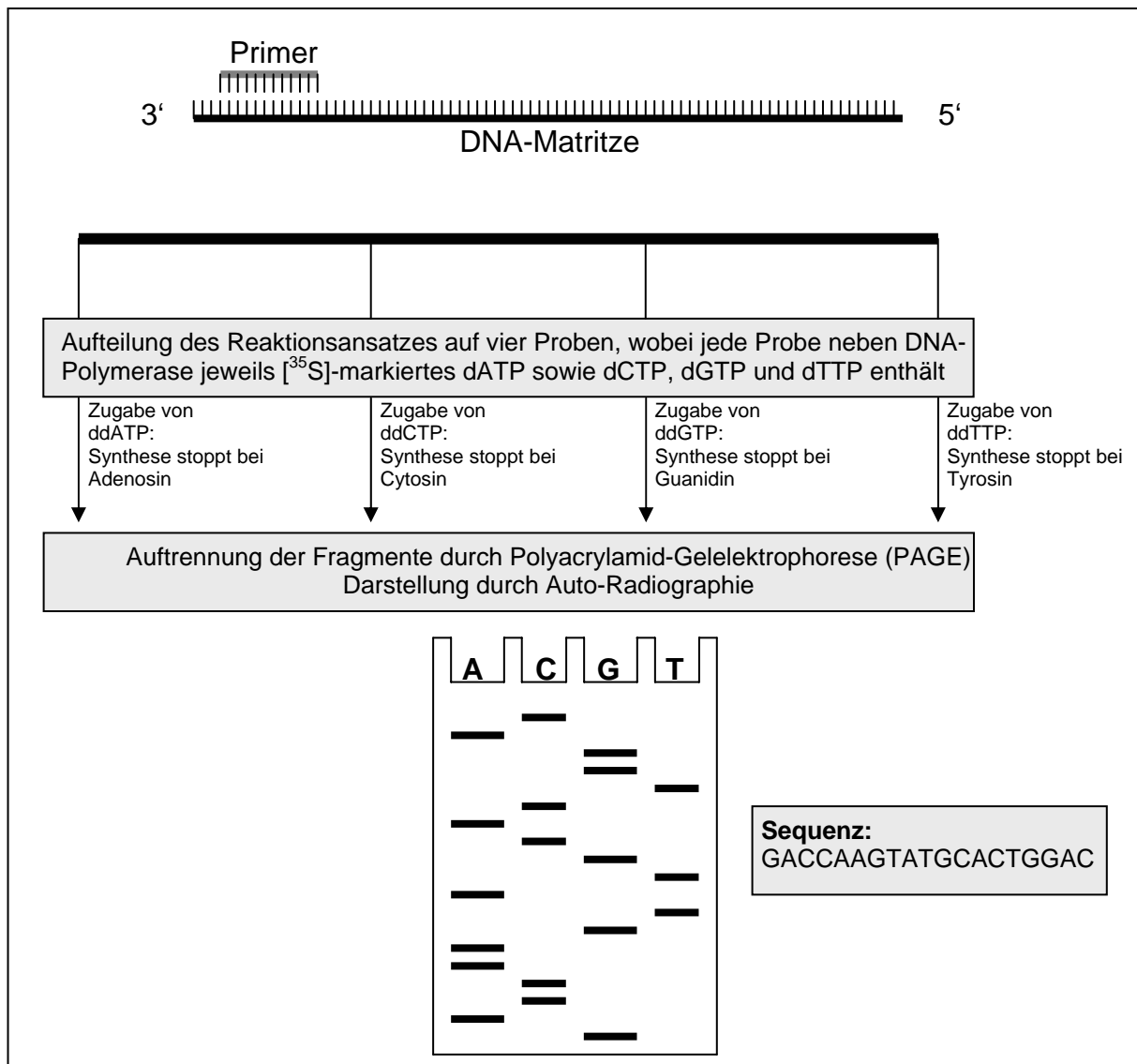


Abb. 10: Schematische Darstellung der DNA-Sequenzierung mittels der Kettenabbruch-Methode nach Sanger.

3.2.3 PROTEIN-EXPRESSION

3.2.3.1 Zellkultur mit CV1-Zellen

CV1-Zellen wurden als Monolayer in DMEM mit 5-10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden alle 3 – 4 Tage passagiert, indem das Medium abgesaugt und Trypsinlösung (0,25 % mit 2mM EDTA) zugegeben wurde, bis sich die Zellen ablösten. Nach Absaugen des Trypsins erfolgte die Resuspendierung in Medium mit FKS und das Aussäen in neue Kulturgefäße.

3.2.3.2 Vacciniavirus-Expressionssystem

Zur transienten Expression der Chimären-Gene und der Mutanten in CV1-Zellen wurde ein spezielles rekombinantes Vaccinia Virus, vTF7-3, verwendet [Fuerst et al., 1986; Mackett und Smith, 1986; Moss und Flexner, 1987; Elroy-Stein und Moss, 1990; Moss et al., 1990; Sutter et al., 1995; Ward et al., 1995]. Das Vaccinia-Virus gehört zu der Familie der Orthopoxviren und wird seit langem erfolgreich als Vektor zur Expression von Fremdgenen in eukaryotischen Zellen verwendet [Fuerst et al. 1986]. Da sich das Virus, welches ein doppelsträngiges, etwa 190 kb großes DNA-Genom trägt, im Zytoplasma und nicht im Zellkern vermehrt, konnte ein zweistufiges Expressionssystem für transiente Expression von fremden Proteinen entwickelt werden. Zuerst wurden eukaryotische Zellen (CV1) mit einer speziell konstruierten, rekombinanten Form des Vaccinia-Virus infiziert, welche das Gen für die RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 enthält (vTF7-3 Virus). Die infizierten Zellen produzierten daraufhin im Cytoplasma die RNA-Polymerase. Nach Transfektion der Zellen mit einem speziell entwickelten Plasmid (pTM1), in welchem das gewünschte Gen unter der Kontrolle eines T7-Promotors lokalisiert ist, erkennt die T7-RNA-Polymerase auf dem Plasmid vorliegende T7-Promotoren und transkribiert das darauf folgende Gen sehr wirkungsvoll in mRNA, die wiederum in Protein translatiert wird [Moss et al., 1990].

Zur Zellkultur wurden CV1-Zellen (Nierenzellen der Afrikanischen Grünen Meerkatze) in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit Zusatz von 5 % FKS, 100 IE / ml Penicillin und 100 µg / ml Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt kultiviert. Die Protein-Expression wurde mit dem Vacciniavirus T7 RNA-Expressionssystem durchgeführt [Fuerst et al., 1986]. CV1-Zellen mit einer Konfluenz von 70 – 80 % auf 35 mm Zellkulturschalen wurden mit 10 pfu / Zelle in 500 µl Medium ohne FKS mit dem rekombinanten Vaccinia-Virus vTF7-3 infiziert. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C wurde das Virus-Inokulum entfernt, und die Zellen wurden gewaschen und danach mit dem interessierenden Gen transient transfiziert. Hierzu wurde Lipofektin 1:10 mit Medium ohne FKS auf ein Gesamtvolumen von 100 µl verdünnt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert [Staggs et al., 1996; Verma et al., 1998]. Die Lipofektin-Lösung wurde dann mit 2 µg des interessierenden Gens im Vektor pTM1 in 100 µl Medium ohne FKS in einem Polystyren-Röhrchen vermischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, damit sich DNA-Lipofektin-Komplexe bilden konnten. Hiernach wurde dieses Gemisch auf das Volumen von 600 µl mit Medium ohne FKS aufgefüllt und auf die gewaschenen infizierten Zellen gegeben. Nach weiteren 4 h Inkubation bei 37 °C wurde das Lipofektin- / DNA-Gemisch entfernt und die Zellen metabolisch markiert (*Abb. 11*).

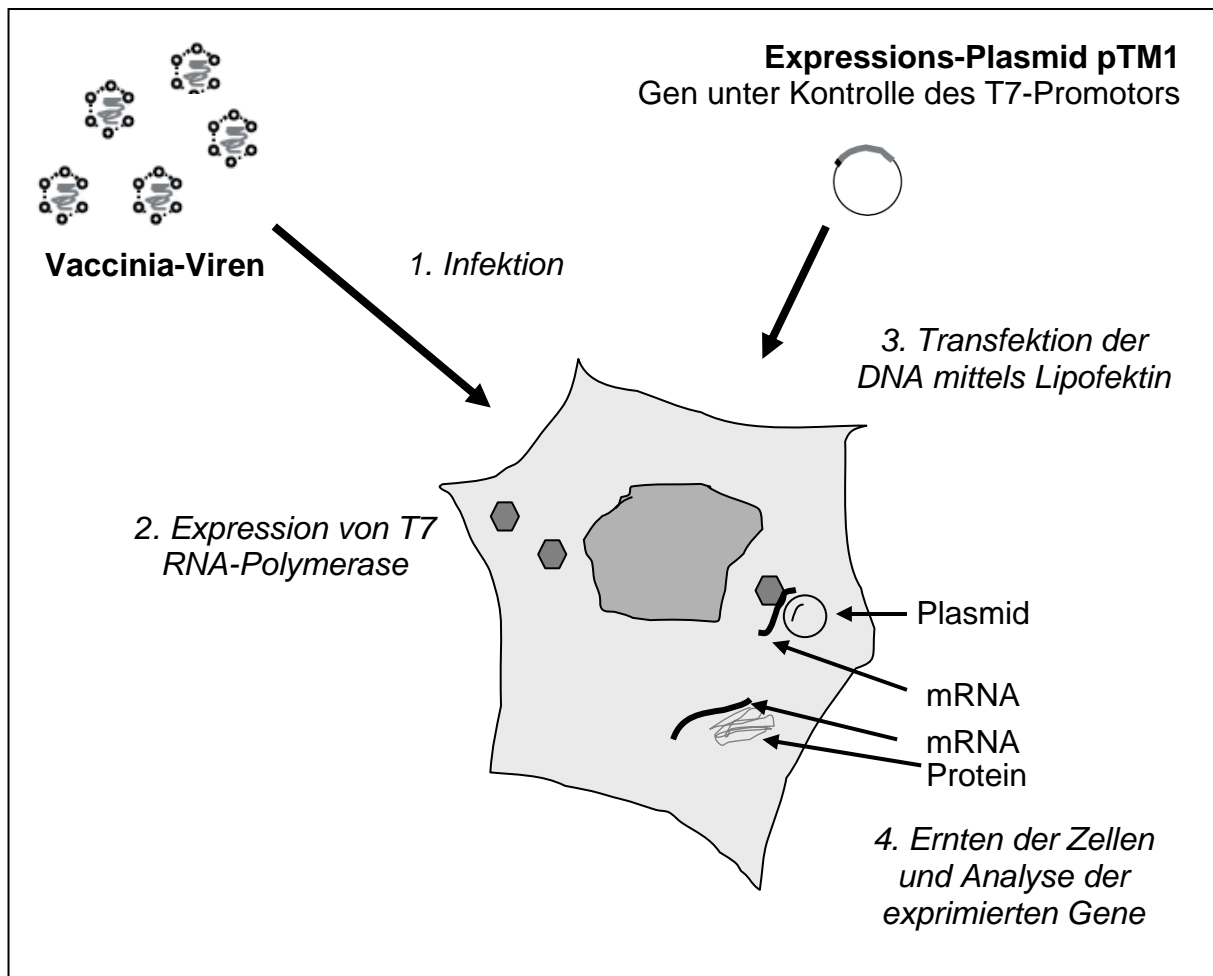


Abb. 11: Schematische Darstellung des Vacciniavirus-Expressionssystems.

3.2.4 PROTEIN-CHARAKTERISIERUNG

3.2.4.1 Metabolische Markierung mit [³⁵S]-Methionin und [³H]-Palmitinsäure

Zur Charakterisierung der exprimierten Konstrukte wurde eine metabolische Markierung mit [³⁵S]-Methionin und zum Nachweis der Palmitoylierung eine Markierung mit [³H]-Palmitinsäure durchgeführt. Hierzu wurde nach der Transfektion ein Teil der Zellen in Methionin-freiem Minimal Essential Medium (MEM/Met-) aufgenommen und 1 h bei 37 °C inkubiert, wonach sie mit 30 µCi [³⁵S]-Methionin in 600 µl MEM/Met- für 5 h markiert wurden. Der andere Teil der Zellen wurde mit serumfreiem DMEM für 1 h vorinkubiert und danach mit 300 µCi [³H]-Palmitinsäure in 600 µl DMEM markiert und für 5 Stunden inkubiert [Veit et al., 2002]. Hiernach wurden die Zellen zweimal in eiskaltem PBS-Puffer gewaschen und dann in eiskaltem RIPA-Puffer lysiert. Nach Abzentrifugation der unlöslichen Zellbestandteile wurde dem Überstand ein gegen das Sendai-Virus gerichteter polyklonaler Antikörper zur Immunpräzipitation zugegeben und über Nacht bei 4 °C geschüttelt. Nach Zugabe von 40 µl

Protein A-Sepharose Beads wurden die Proben 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Das Pellet wurde zweimal mit eiskaltem RIPA-Puffer gewaschen, um eine unspezifische Proteinbindung zu minimieren. Dann wurden die Immunkomplexe nach einminütigem Aufkochen in reduzierendem Elektrophorese-Probenpuffer durch Zentrifugation von den Protein A-Sepharose Beads getrennt.

3.2.4.2 Quantifizierung des [³⁵S]- und [³H]- Einbaus

Die Auftrennung der radioaktiv markierten Proteine nach ihrer Größe erfolgte mit Hilfe der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) über ein 5 % Sammelgel und ein 12 % Trenngel bei einer Spannung von 150 V [Laemmli, 1970]. Zusätzlich zu den Proben lief ein vorgefärbter Größenstandard mit. Die Banden wurden bei den radioaktiv markierten Proteinen durch Fluorographie sichtbar gemacht, wozu nach der Elektrophorese die aufgetrennten Proteine im Gel fixiert und danach mit 1 M Natrium-Salicylat imprägniert wurden, um das radioaktive Signal zu verstärken. Das Gel wurde auf Whatman-Papier überführt und in einem Geltrockner unter Vakuum bei 80°C getrocknet. Hiernach wurde ein Röntgenfilm aufgelegt, der bei [³⁵S]-Markierung für einen Tag beziehungsweise bei [³H]-Markierung für fünf Tage bei -80 °C belichtet und dann entwickelt wurde. Die Quantifizierung der Expression erfolgte durch Einscannen des Filmes und Densitometrie. Der [³H]-Palmitinsäure-Einbau wurde relativ zur Stärke der Protein-Expression, dargestellt durch die Markierung mit [³⁵S]-Methionin, ermittelt und auf die Anzahl der Methionin- und Cystein-Reste der jeweiligen Proteine bezogen.

3.2.4.3 Endoglykosidase-Verdau

Die Kontrolle der Glykosylierung in den exprimierten Proteinen wurde mittels Endoglykosidase-Verdau nach Hersteller-Angaben durchgeführt [Spiro, 2002]. Hierzu wurden transfizierte und [³⁵S]-markierte Zellen wie unter Punkt 3.2.4.1 beschrieben inkubiert, lysiert, Immunpräzipitiert und mit Protein A-Sepharose Beads aufgereinigt. Danach wurde der Überstand auf drei Ansätze aufgeteilt. Eine Probe wurde dem Verdau mit der Endoglykosidase H (Endo H) unterzogen, mit dem die High Mannose-Seitenketten abgespalten wurden, die zweite Probe wurde mit Peptid-N-Glykosidase F (PNGase F) verdaut, um alle N-glykosidisch gebundenen Seitenketten abzuspalten, und die dritte Probe wurde als Kontrolle verwendet. Die Quantifizierung des [³⁵S]-Methionin-Einbaus erfolgte wie unter Punkt 3.2.5.2 beschrieben.

3.2.4.4 Indirekte Immunfluoreszenz

Mittels indirekter Immunfluoreszenz können Unterschiede im intrazellulären Transport exprimierter Proteine sichtbar gemacht werden, indem nur die an die Zelloberfläche gelangten Proteine mit Fluoreszenzfarbstoff markiert werden können. Hierzu wurden auf mit poly-L-Lysin behandelten Deckgläschen gewachsene CV1-Zellen mittels des Vacciniavirus-Expressionssystems mit den interessierenden Genen im Vektor pTM1 transfiziert (siehe Punkt 3.2.3.2) und für 5 Stunden bei 37 °C in Serum-freiem DMEM inkubiert. Hiernach wurden die Zellen mit 3% Paraformaldehyd in PBS für 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Die Zellen wurden zunächst mit dem ersten Antikörper, Anti-Sendaivirus aus dem Kaninchen in PBS mit 2% BSA, in einer Konzentration von 1:200 versetzt und für 1 h bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach gründlichem Waschen der Zellen, um nicht-gebundene Antikörper zu entfernen, wurde der FITC-markierte zweite Antikörper, der gegen Kaninchen-IgG gerichtet war, zu den Zellen in einer Konzentration von 1:50 gegeben, worauf erneut inkubiert und gründlich gewaschen wurde. Die Deckgläschen wurden dann mit 90% Glycerin in PBS auf Objektträger gebracht und die Zellen im Fluoreszenz-Mikroskop durchgemustert und in 630-facher Vergrößerung photographisch dokumentiert.

3.2.4.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Analyse von Einzelzellen in Suspension auf Grundlage ihrer Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften und gibt Auskunft über die relative Größe, relative Granularität und relative Fluoreszenz-Intensität der Einzelzelle (*Abb. 12*). Für letzteres werden die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern markiert, wobei die gebundene Farbstoffmenge direkt proportional zu der Anzahl der Oberflächen-Antigene ist. In dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie verwendet, um die Oberflächenexpression der membranständigen Chimärenproteine und Mutanten zu überprüfen. In 35 mm Kulturschalen gewachsene CV1-Zellen wurden mittels des Vacciniavirus-Expressionssystems mit den interessierenden Genen im Vektor pTM1 transfiziert (siehe Punkt 3.2.3.2) und für 5 Stunden bei 37 °C in Serum-freiem DMEM inkubiert. Die Zellen wurden dann zweifach mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen, mit Trypsin von der Schale abgelöst (siehe Punkt 3.2.3.1) und in PBS mit 2 % BSA resuspendiert. Ein Volumen von 5×10^5 Zellen wurde für die Durchflusszytometrie verwendet. Die Zellen wurden zunächst mit dem ersten Antikörper, Anti-Sendaivirus aus dem Kaninchen, in einer Konzentration von 1:100 versetzt und abgedunkelt für 20 min bei 4 °C inkubiert. Nach gründlichem Waschen der Zellen, um nicht-gebundene Antikörper zu

entfernen, wurde der FITC-markierte zweite Antikörper, der gegen Kaninchen-IgG gerichtet war, zu den Zellen in einer Konzentration von 1:50 gegeben, worauf erneut eine Inkubation von 20 min abgedunkelt bei 4 °C und gründliches Waschen erfolgte. Im Anschluss daran wurden die markierten Zellen im Durchflusszytometer gegen eine nicht-markierte Kontrollprobe gemessen und die relative Fluoreszenz-Intensität ermittelt.

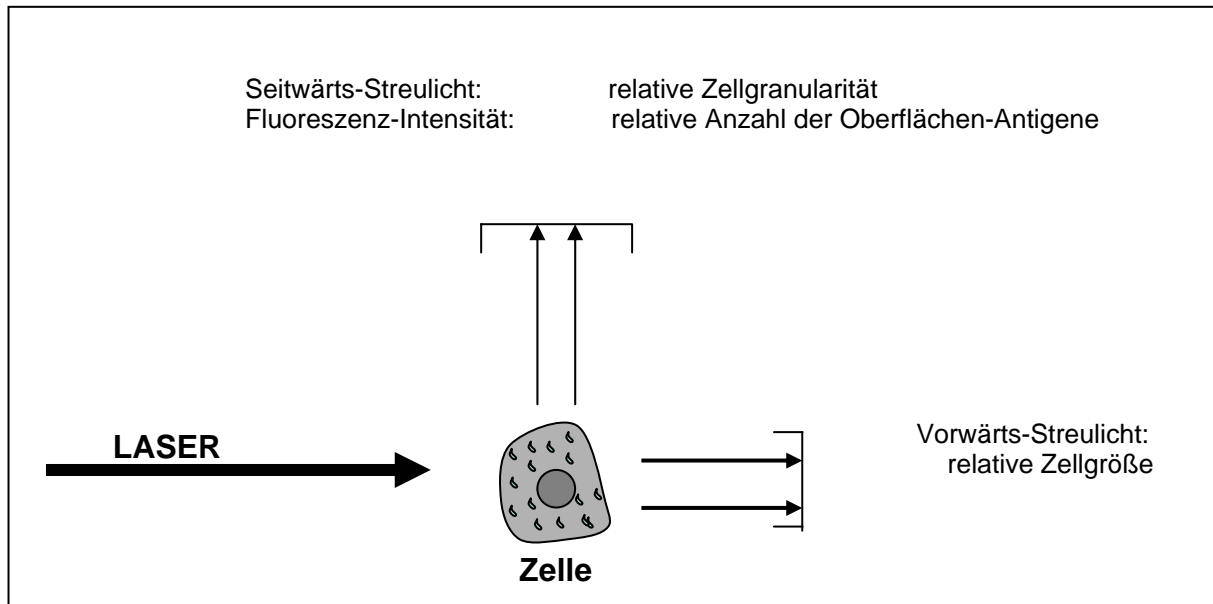


Abb. 12: Schematische Darstellung der Durchflusszytometrie.

3.2.5 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die Dateneingabe erfolgte in Microsoft Office Excel 2003. Die statistische Auswertung wurde mittels des Statistikprogramms SPSS 12.0 für Windows mit der Prozedur „T-Test bei einer Stichprobe“ durchgeführt, bei dem eine Stichprobe gegen eine Vergleichsprobe daraufhin untersucht wird, ob sie gleich sind (Nullhypothese H_0) oder sich unterscheiden (Alternativhypothese H_1). Irrtumswahrscheinlichkeiten von $p > 0,05$ werden als nicht signifikant, $p \leq 0,001$ als höchst signifikant bezeichnet.

3.3 ZUSAMMENSETZUNG DER VERWENDETEN PUFFER UND MEDIEN

CaCl ₂ -Lösung	60 mM CaCl ₂ 10 mM PIPES, pH 7 15% Glycerin
Elektrophorese-Probenpuffer (reduzierend)	31.25 mM Tris-HCl, pH 6,8 10% Glycerin 3% SDS 0.5% Bromphenolblau 10% β-Mercaptoethanol
Fixier-Lösung	10% Methanol 10% Essigsäure
LB-Agar	LB-Medium mit 2% Agar
LB-Medium	1% Trypton 0,5% Hefeextrakt 1% NaCl, pH 7,0
PBS-Puffer	20 mM Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , pH 7,4 0,8% NaCl 0,02% KCl
RIPA-Puffer	1% Triton X-100 1% Natriumdesoxycholat 0.1% Natriumdodecylsulfat (SDS) 0.15 M Natriumchlorid 20 mM EDTA 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) 10 mM Jodacetamid
SOB-Medium	2% Trypton 0,5% Hefeextrakt 10 mM NaCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄
SOC-Medium	SOB- Medium mit 20 mM Glukose
STET-Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 8.0 8% Sucrose 0,1% Triton X-100 50 mM EDTA

Stop-Puffer	73 mM Saccharose 100 mM Tris-HCl, pH 7,6 63 mM EDTA 1% Bromphenolblau
TAE-Puffer	40 mM Tris, pH 8,3 40 mM Eisessig 1 mM EDTA
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,6 oder pH 8 0, 1 mM EDTA
YT-Medium	1% Hefeextrakt 1% NaCl 1,6% Trypton, pH 7.5