

## 3. Methoden

### 3.1 Nukleinsäure-Techniken

#### 3.1.1 DNA-Amplifikation mit Hilfe der PCR

Zur *in vitro*-Amplifikation von DNA wurde die Polymerasen-Ketten-Reaktion (PCR) angewendet. Sie wurde (nach Mullis und Faloona, 1987) mit Hilfe thermostabiler DNA-Polymerasen in 25 bis 35 Zyklen durchgeführt. Ein Zyklus bestand aus:

Hitzenaturierung der Matrizen-DNA: 95 °C, 45 sek

Primeranheftung: je nach Primer 55-65 °C, 45 sek

Kettenverlängerung: 72 °C, 30 sek bei DNA-Strängen von wenigen Hundert, 90 sek bei Strängen mit mehr als 1000 erwarteten Basenpaaren

Die hergestellten DNA-Stränge wurden nach ihrer Herstellung kloniert und dienten anschließend in Bakterien oder in eukaryotischen Zellen zur Proteinexpression. Daher wurde ein DNA-Polymerasen-Mix verwendet (CombiPol, Invitex), der neben einer hohen Prozessivität eine hohe Fidelität besaß. Letztere wurde durch die enthaltene 3'→5'-Exonukleaseaktivität gewährleistet, die Fehler bei der DNA-Synthese korrigiert.

Der Standard PCR-Ansatz hatte folgende Zusammensetzung:

Reagenz	Konzentration bzw. Menge im 50 µl-Ansatz
DNA-Matrize	1 µl
OptiPerform Puffer III (10×)	5 µl
OptiZyme <i>Enhancer</i> (5×)	10 µl
MgCl <sub>2</sub> [50 mM]	2 µl [2 mM]
dNTP's	je 0,2 mM
3'- und 5'-Primer	je 25 pmol
CombiPol-Polymerase	1 U
Mineralöl	50 µl

### 3.1.2 Agarosegelelektrophorese von DNA

Vektor-DNA oder DNA-Produkte einer PCR wurden in 1%-igen Agarosegelen (1% Agarose, 0,5  $\mu\text{g/ml}$  Ethidiumbromid, 1 $\times$ TAE-Puffer) aufgetrennt und analysiert. Hierzu wurden die DNA-Proben mit 1/10 Volumen 10 $\times$  Probenpuffer (Kap. 2.10) gemischt und auf das Gel aufgetragen. Nach einer dreißigminütigen Elektrophorese in 1 $\times$ TAE-Puffer bei 100 V wurden die Gele auf dem UV-Leuchttisch ausgewertet. Als Größenstandard diente die 1 kb DNA *Ladder* von MBI-Fermentas, sie liefert 14 Banden folgender Längen (in Basenpaaren): 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250.

### 3.1.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten (Plasmid-DNA oder PCR-Produkte) aus Agarosegelen erfolgte mittels Zentrifugation. Dazu wurde in den Boden eines 0,5 ml Reaktionsgefäßes mit einer Kanüle ein Loch gestochen und mit einem Glaswollepfropf abgedichtet. Die DNA-Banden wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in das Reaktionsgefäß gegeben. Dieses wurde in ein 2,0 ml Reaktionsgefäß gestellt und 20 min bei 13000  $\times$  g zentrifugiert. Anschließend wurde die im Durchlauf befindliche DNA mit einer Phenol/Chloroformextraktion aufgereinigt und mit Ethanol gefällt (Kap. 3.1.4).

### 3.1.4 Reinigung von DNA aus wässrigen Lösungen

#### **Phenol/Chloroform-Extraktion:**

Proteine wurden aus wässrigen DNA-Lösungen durch eine Extraktion mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1, v/v/v) entfernt. Das verwendete Phenol (Roth) war mit 10 mM Tris pH 8,0, 1mM NaEDTA gepuffert. Zu der DNA-Probe wurde das gleiche Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol gegeben, 10 sek mit dem Vortex-Mixer gemischt und 15 sek mit höchster Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Die wässrige, obere Phase mit der DNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die organische Phase enthielt die Proteine. Hatte sich an der organisch-wässrigen Interphase eine größere Menge weißen Präzipitates angesammelt wurde die Extraktion wiederholt.

### **DNA-Fällung mit Ethanol:**

Nach einer Phenol-Extraktion wurde 1/10 Volumen 3 M Natriumacetatlösung pH 5,2 zu der DNA-Lösung gegeben, gemischt und mit dem 2,5-fachen Volumen eisgekühltem Ethanol (100 %) aufgefüllt. Nach erneutem Mischen wurden die Proben 30 min bei -20 °C inkubiert, danach 10 min bei höchster Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Entfernung von Salzen wurde die gefällte DNA in 70 % Ethanol (RT) aufgenommen, durch Kippen gemischt und 5 min bei Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert. Der Zentrifugationsüberstand wurde verworfen, das DNA-Pellet 10 min an der Luft getrocknet und in ddH<sub>2</sub>O gelöst.

### **3.1.5 Enzymatische Spaltung von DNA**

Die enzymatische Spaltung von DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen nach Herstellerangaben in mitgelieferten Puffern durchgeführt. Für 1 µg Plasmid-DNA oder die DNA-Produkte eines PCR-Ansatzes wurde 1 U der Endonukleasen eingesetzt und 2 h bis über Nacht bei 37 °C inkubiert. Plasmid-DNA wurde danach in einem Agarosegel aufgetrennt (Kap. 3.1.2) und das linearisierte Plasmid aus dem Gel isoliert (Kap. 3.1.3), wenn es für eine Ligation (Kap. 3.1.7) verwendet wurde.

### **3.1.6 Abspaltung von 5'-Phosphatresten durch alkalische Phosphatase**

Vor einer Ligation wurden die 5'-Enden der linearisierten Plasmid-DNA durch alkalische Phosphatase (1 U/10 µg Plasmid-DNA, 1 h, 37 °C) dephosphoryliert. Durch die Dephosphorylierung sollte eine intramolekulare Religation ohne Einbau eines DNA-Fragmentes verhindert werden. Die Phosphatase wurde anschließend durch Erwärmen (10 min, 70 °C) inaktiviert, das Plasmid mit Ethanol präzipitiert und in ddH<sub>2</sub>O gelöst.

### **3.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten**

Die Vektor-DNA und das zu klonierende DNA-Fragment (z.B. ein PCR-Produkt) waren mit denselben Restriktionsendonukleasen behandelt worden. Ein Standardligationsansatz enthielt 100 ng des zu klonierenden DNA-Fragmentes, 100 ng des linearisierten Vektors, 2 µl 10× Ligationspuffer, 1U T4 DNA Ligase, ad 20 µl ddH<sub>2</sub>O und erfolgte bei 16 °C über Nacht.

## 3.2 Klonierung von DNA

### 3.2.1 Bereitstellung transformationskompetenter *E.coli*-Bakterien

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten wurden die *E.coli*-Stämme DH5- $\alpha$  und TOP10/P3 verwendet. 4 ml LB-Medium wurden mit einer Bakterienkolonie von einer LB-Kulturplatte angeimpft und ü.N. bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden 3 ml der Bakterienkultur in einen 2 l Kolben mit 100 ml TYM-Medium (Kap. 2.9) überführt. Bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 - 0,9 wurde die Bakteriensuspension mit TYM-Medium auf 500 ml aufgefüllt und bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 weiterkultiviert. Danach wurde die Kultur in einem Eisbad abgekühlt und für 10 min (3000 × g, 4 °C) zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 100 ml eiskaltem Transformationspuffer I (Kap. 2.10) suspendiert. Nach 15 min im Eisbad wurde erneut zentrifugiert (10 min, 3000 × g, 4 °C) und die Zellen in 20 ml Transformationspuffer II suspendiert. Die kompetenten Zellen wurden in 200  $\mu$ l-Portionen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Transformation bei -80 °C gelagert.

### 3.2.2 Transformation

50 ng der ligierten, rekombinanten Plasmid-DNA wurden mit 100  $\mu$ l kompetenten Bakterien für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz für 90 sek bei 42 °C, für 2 min auf Eis und schließlich mit 400  $\mu$ l LB-Medium (37 °C) für 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Selektion der transformierten Klone erfolgte auf LBA-Agar-Platten (Kap. 2.9), auf denen jeweils 200  $\mu$ l des Transformationsansatzes ausgestrichen waren (ü.N., 37 °C).

## 3.3 Isolierung von Plasmid-DNA

### Analytische Schnellpräparation (alkalischer Bakterienaufschluß):

Klone wurden in 3 ml Selektionsmedium überimpft, ü.N. bei 37 °C geschüttelt und am nächsten Tag 1,5 ml der Bakterienkultur in der Tischzentrifuge (3 min, 3000 Upm) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100  $\mu$ l P1-Puffer (Kap. 2.10) suspendiert, 175  $\mu$ l P2-Puffer zugegeben und durch fünfmaliges kippen gemischt. Nach einer Inkubation von 5 min bei

Raumtemperatur wurden 175  $\mu$ l P3-Puffer zugegeben, erneut gemischt und für 10 min bei 13000  $\times$  g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid-DNA mittels Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung gereinigt (Kap. 3.1.4).

#### **Präparative Plasmidisolierung:**

Für die präparative Plasmidisolierung wurden Bakterienklone in 400 ml Medium über Nacht bei 37 °C geschüttelt und am nächsten Tag für 15 min bei 3500  $\times$  g zentrifugiert. Die Plasmidisolierung erfolgte nach dem Prinzip der Anionenaustauscher-Säulenchromatographie mit Hilfe der „JetStar“ Plasmidisolierungssäulen und Puffer (Genomed). Die Aufreinigung wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

### **3.4 DNA-Sequenzierung**

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruch-Methode durch den Einbau von Didesoxynukleotiden nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Hierzu wurde das „Thermo Sequenase *fluorescent labelled primer cycle sequencing kit*“ (Amersham Pharmacia) verwendet. Der Einbau von 2', 3'-Didesoxynukleotiden während der Sequenzierreaktion (PCR) führte zum Abbruch der Polymerisierung und damit zu Produkten unterschiedlicher Länge. Aufgrund der verwendeten, 5'-fluoreszenzmarkierten Primer (MWG-Biotech) ließen sich die Produkte nach Laseranregung in einem Sequenziergel detektieren.

#### **Sequenzierreaktion:**

3  $\mu$ g Plasmid-DNA wurden mit je 2 pmol 5'-fluoreszenzmarkierten Primern, 1,4  $\mu$ l DMSO und ddH<sub>2</sub>O in einem Gesamtvolumen von 21  $\mu$ l gemischt. Der Ansatz wurde auf vier 4,5  $\mu$ l-Ansätze aufgeteilt zu denen jeweils 1,5  $\mu$ l der mitgelieferten Reagenzien A, C, G oder T zugegeben wurden. Die Reagenzien enthielten neben der DNA Polymerase (Thermo Sequenase) auch die Desoxynukleotide und jeweils eines der Didesoxynukleotide ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP. Die Ansätze wurden mit 50  $\mu$ l Mineralöl überschichtet und anschließend eine PCR mit folgendem Ablauf durchgeführt: (1) 95 °C, 2 min, (2) 95 °C, 15 sek, (3) 52 °C, 15 sek, (4) 70 °C, 15 sek, 30 Zyklen (2)→(4). Nach Abschluß der PCR wurden 6  $\mu$ l Probenpuffer zugegeben.

### **Sequenzierung in Polyacrylamid-Harnstoffgelen mit dem Li-Cor-System:**

Die Auftrennung der einzelsträngigen, fluoreszenzmarkierten DNA-Moleküle bis 1000 Bp erfolgte in denaturierenden Polyacrylamid-Harnstoffgelen (Kap. 2.10) von 0,25 mm Dicke und 66 cm Länge. Die Gellösung wurde luftblasenfrei durch einen Spritzenfilter zwischen die beiden Glasplatten der Gelapparatur gegossen um Staubpartikel aus der Gellösung zu entfernen. Nach der Polymerisierung wurde das Gel in die „Li-Cor 4200“ Sequenzieranlage (MWG-Biotech) eingespannt, die Pufferkammern mit  $1 \times$  TBE Puffer (*Long Run*; Kap. 2.10) befüllt und ein dreißigminütiger Vorlauf durchgeführt. Anschließend wurden die Probentaschen gespült, 1,2  $\mu$ l der Proben aus der Sequenzierreaktion geladen und bei 2200 V (37 mA, 50 W) und 45 °C über Nacht sequenziert. Die Auswertung der Banden erfolgte mit einem Computer.

### **3.5 Einführung von Mutationen in DNA mittels PCR**

In die Nukleotidsequenz des US28 Rezeptors wurden mit Hilfe der PCR Punktmutationen eingeführt. Die verwendeten, synthetischen PCR-Primer enthielten von der US28-Nukleotidsequenz abweichende Basenabfolgen, die für die gewünschte Änderung in der Aminosäuresequenz kodierten. Zunächst wurde in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1(-) die vollständige US28-Sequenz, wie sie durch den HCMV Stamm AD169 kodiert ist, kloniert. Hierzu wurde eine PCR mit den Primern US28wt-s (5'-Primer) und US28wt-as (3'-Primer) und der cosmidischen AD169-Genombank als Matrize durchgeführt. Über den 5'-Primer wurde eine *Xba* I und über den 3'-Primer eine *Hind* III Schnittstelle in das PCR-Produkt eingeführt. Über diese Schnittstellen wurde das PCR-Produkt in das pcDNA3.1(-) Plasmid inkloniert.

Zum Austausch des Tyrosinrestes an Position 16 des US28 Rezeptors durch ein Phenylalanin- oder ein Alaninrest wurden die 5'-Primer Y16F-s oder Y16A-s (Kap. 2.5) zusammen mit dem 3'-Primer US28wt-as verwendet. Als Matrize der PCR diente eine Cosmid-Bank des HCMV-Genoms (Stamm AD169; Kap. 2.3). Die Primer führten am 5'-Ende des PCR-Produktes eine *Sac* II Schnittstelle (Y16F-s, Y16A-s) und am 3'-Ende eine *Hind* III (US28wt-as) Schnittstelle ein. Für die Klonierung des PCR-Produktes wurde ein pcDNA3.1(-) Plasmid verwendet, das die US28 Wildtypsequenz enthielt und vor der Ligation ebenfalls mit

den Endonukleasen *Sac* II (Position 23 der US28-Nukleotidsequenz) und *Hind* III (3'-Ende der US28-Nukleotidsequenz) behandelt worden war.

Für den Austausch der Threonine an Position 337 und 341 gegen Alaninreste der US28-Aminosäuresequenz wurde eine PCR mit den Primern US28wt-s (5') und ST/A-as (3') und dem Plasmid US28<sup>S1-12A</sup> (pcDNA3.1(-); Kap. 2.3) als Matrize durchgeführt. Die resultierende Nukleinsäuresequenz codierte für einen US28 Rezeptor, bei dem zusätzlich zu den carboxyterminalen Serinresten (US28<sup>S1-12A</sup>) auch die Threonine an Position 337 und 341 gegen Alaninreste ausgetauscht waren (US28<sup>ST/A</sup>). Das PCR-Produkt wurde über die *Xba* I Schnittstelle am 5'-Ende und die *Hind* III Schnittstelle am 3'-Ende des PCR-Produktes in das pcDNA3.1(-) Plasmid kloniert. Nach den Klonierungen wurden die US28-Nukleotidsequenzen mittels einer DNA-Sequenzierung (Kap. 3.4) überprüft.

### 3.6 Herstellung rekombinanter Fusionsproteine

Für die bakterielle Proteinexpression wurde der *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  sowie der Expressionsvektor pGEX-4T-1 verwendet. Mit dem pGEX-4T-1 Vektor wurde ein Fusionsprotein hergestellt, das einen N-terminalen Glutathion-S-Transferase(GST)-Anteil besaß, der durch den Vektor kodiert war und zur Aufreinigung des Fusionsproteins diente. Der C-terminale Anteil des rekombinanten Fusionsproteins umfasste die 51 N-terminalen Aminosäuren des US28-Rezeptors. Dieser Abschnitt repräsentiert den extrazellulären N-Terminus und einen Teil der ersten Transmembrandomäne von US28. Das rekombinante GST-US28-Fusionsprotein wurde als GST-US28<sup>1-51</sup> bezeichnet.

#### 3.6.1 Klonierung von Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteinen

Es wurde eine PCR mit dem Oligonukleotid-5'-Primer US28gex-s, dem 3'-Primer US28gex-as und der Cosmid-Bank des HCMV-Genoms (Stamm AD169; Kap. 2.3) als Matrize durchgeführt. Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden über die *Bam*H I und die *Eco*R I Restriktionsendonukleasen-Schnittstelle in das pGEX-4T-1 Plasmid eingefügt. Nach der Klonierung in *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen wurde die Nukleotidsequenz der Plasmid-DNA durch eine DNA-Sequenzierung (Kap. 3.4) mit den Sequenzierprimern GEX-5' und GEX-3' (Kap. 2.5) überprüft.

### 3.6.2 Induktion der Proteinexpression

Der verwendete Expressionsvektor pGEX-4T-1 enthält den IPTG-induzierbaren *lac*-Promotor (ein Hybrid aus dem *lac*- und dem *trp*-Promotor). Durch die Zugabe von IPTG, einem Strukturanalogon des natürlichen Induktors Allolaktose, kann die Expression des Fremdgens in der Bakterienkultur (*E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$ ) induziert werden. Die Bindung des IPTG an den *lac*-Repressor führt zu dessen Inaktivierung, so daß die Transkription des Fremdgens erfolgen kann.

Für die Expression der rekombinanten GST-US28-Fusionsproteine wurde eine Bakterienkolonie in 3 ml LBA-Medium überimpft und ü.N. bei 37 °C geschüttelt. 1 ml dieser Vorkultur wurde am nächsten Tag in 33 ml frischem LBA-Medium verdünnt bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 inkubiert, anschließend auf 1000 ml LBA-Medium aufgefüllt und bei 37 °C weiterkultiviert. Bei dem Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 wurde die Expression des Fremdgens durch Zugabe von 0,5 mM IPTG zur Bakterienkultur induziert. Nach einer vierstündigen Inkubation bei 37 °C wurden die Bakterien für 15 min bei 3000  $\times$  g zentrifugiert.

### 3.6.3 Bakterienaufschluß

Die zentrifugierten Bakterien wurden in 35 ml kaltem Lysepuffer (Kap. 2.10) suspendiert und in einer *French-Press* bei 4 °C, 1000 bar aufgeschlossen. Nach einer Rotation des Aufschlusses für 30 min bei 4 °C wurden unlösliche Bestandteile durch eine Zentrifugation bei 13000  $\times$  g (30 min, 4 °C) aus dem Lysat entfernt. Die klaren Zentrifugationsüberstände wurden für die Reinigung des Proteins verwendet.

### 3.6.4 Proteinreinigung durch Glutathion-Affinitätschromatographie

Die rekombinanten Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteine wurden über ihre Affinität zu reduziertem Glutathion bei 4 °C aufgereinigt. Hierzu wurden die klaren Zentrifugationsüberstände des Bakterienaufschlusses mit einer Durchflußrate von 0,5 ml/min über eine mit Lysepuffer (Kap. 2.10) äquilibrierte Glutathion-Sepharosesäule (1 ml Volumen) gegeben. Anschließend wurde die Säule mit 20 ml 1% Triton X-100/PBSd (v/v) und 20 ml PBSd gewaschen. Danach wurde das Fusionsprotein mit 10 ml Elutionspuffer (10 mM reduziertes Glutathion, 50 mM Tris, pH 8,0) eluiert. Das Eluat wurde in 10 Fraktionen zu je 1 ml auffangen und die enthaltene Proteinmenge photometrisch bestimmt (Proteinkonzentration = 0,6



× A<sub>280</sub> mg/ml). Fraktionen, die Protein enthielten, wurden in einem Dialyseschlauch zusammengeführt und dreimal im Volumenverhältnis 1:500 in PBSd bei 4 °C inkubiert. Das aufgereinigte Fusionsprotein (GST-US28<sup>1-51</sup>) wurde nach der Dialyse in Aliquots bei -20 °C aufbewahrt.

### 3.7 In vitro Transkription und Translation

#### 3.7.1 In vitro Transkription

Die *in vitro* Transkription ermöglicht die Herstellung von RNA einer bestimmten Sequenzabfolge von einer Matrizen-DNA. Als Matrize wurde das Plasmid pcDNA3.1(-) verwendet, welches die cDNA von US28 (5', 3' *Xba* I kloniert) oder als Kontrolle von C-terminal mit einem *Myc*-Epitop versehenem CXCR4 enthielt (beide Plasmide s. Kap. 2.3). Die Plasmide wurden vor der *in vitro* Transkription mit der Restriktionsendonuklease *EcoR* I linearisiert. Das linearisierte Plasmid wurde aus einem 1%-igen Agarosegel isoliert (Kap. 3.1.3), zweimal Phenol/Chloroform, einmal Chloroform aufgereinigt, mit Ethanol gefällt (Kap. 3.1.4) und in DEPC behandeltem ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

Die *in vitro* Transkription wurde mit dem „*Riboprobe in vitro Transcription System*“ (Promega) in 2 h bei 37 °C nach Herstellerangaben durchgeführt. Ein Transkriptionsansatz enthielt:

Transkriptions-Puffer (5×)	20 μl
100 mM DTT	10 μl
RNasin (40 U/μl)	2,5 μl
ATP, CTP, GTP, UTP-Mix (je 2,5 mM)	20 μl
Matrizen-DNA (1 - 2,5 mg/ml)	2 μl
T7 RNA Polymerase (20 U/μl)	2 μl
Nuklease-freies ddH <sub>2</sub> O (ad 100 μl)	43,5 μl

Anschließend wurde die RNA auf die gleiche Weise aufgereinigt, wie oben für die linearisierten Plasmide beschrieben und in 20 μl Nuklease-freiem ddH<sub>2</sub>O gelöst. 2 μl der Probe wurden in einem Agarosegel nach Angaben des Herstellers analysiert, bevor die hergestellte RNA als Substrat für eine *in vitro* Translation (Kap. 3.7.2) verwendet wurde.

### 3.7.2 *In vitro* Translation

Die gezielte Biosynthese von US28-Proteinen in einem zellfreien System erfolgte mit Hilfe von Kaninchen Retikulozytenlysaten (Promega). Die Lysate beinhalten alle Komponenten, die für eine Proteinbiosynthese erforderlich sind (u.a. Ribosomen, Initiations-, Elongations-, Terminationsfaktoren und tRNAs). Als „mRNA“ diente die RNA aus einer *in vitro* Transkription (Kap. 3.7.1), welche vor der Translation für 3 min bei 65 °C denaturiert und anschließend sofort in Eiswasser gekühlt wurde. Die *in vitro* Translation wurde nach Angaben des Herstellers (Promega) durchgeführt. Ein Reaktionssansatz enthielt:

Kaninchen Retikulozytenlysat	35 $\mu$ l
Aminosäure-Mischung (ohne Methionin)	1 $\mu$ l
[ <sup>35</sup> S]Methionin, <i>Redivue</i> (Amersham)	2 $\mu$ l
RNasin (40 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
RNA Substrat	2 $\mu$ l
Nuklease-freies ddH <sub>2</sub> O	9 $\mu$ l

Nach einer Inkubation für 2 h bei 30 °C wurde die Proteinsynthese durch Zugabe von 18  $\mu$ g RNase A pro Ansatz und eine weitere Inkubation für 15 min bei 30 °C beendet. Die synthetisierten Proteine konnten durch den Einbau radioaktivmarkierten [<sup>35</sup>S]Methionins in einer SDS-PAGE (Kap. 3.17) mit anschließender Autoradiographie analysiert werden.

### 3.8 Zellkultur

Die verwendeten Zelllinien wurden in einem Brutschrank bei 37 °C und einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5%-igem CO<sub>2</sub>-Gehalt kultiviert. Als Standard-Zellkulturmedium wurde DMEM verwendet, dem 10 % FKS (vor der Zugabe durch Hitzebehandlung bei 56 °C für eine Stunde inaktiviert), 100 U/ml Penizillin, 100  $\mu$ g/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin zugesetzt wurde. Davon abweichend enthielt das Medium humaner embryonaler Lungenfibroblasten 7,5 % FKS und zusätzlich 10 mM HEPES. Vor Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit PBSd gewaschen und mit Trypsin-EDTA Lösung (Kap. 2.10) vom Boden abgelöst, in Zellkulturmedium suspendiert und im Verhältnis 1:3 bis 1:10 auf neue Zellkulturflaschen/-schalen verteilt. Für die Kultur muriner Hybridomzelllinien wurde ein spezielles, Hybridomzelllinien-getestetes FKS verwendet. Hybridomzelllinien wurden durch wiederholtes Pipettieren vom Boden abgelöst.

### 3.9 Transfektion von Säugetierzellen mit der Calciumphosphat-Methode

Die Calciumphosphat-Methode wurde verwendet um eine transiente Expression von Fremdgenen in adhären wachsenden Zellen zu erzielen. Einen Tag zuvor wurden die Zellen so ausgesät, daß sie zum Zeitpunkt der Transfektion zu ca. 50 % konfluent gewachsen waren. Alle Puffer und Lösungen wurden auf Raumtemperatur erwärmt. Für die Transfektion einer  $\varnothing$  6 cm Schale wurden 10  $\mu$ g Plasmid, 30  $\mu$ l 2,5 M Calciumchloridlösung in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt, mit sterilfiltriertem ddH<sub>2</sub>O auf 300  $\mu$ l Gesamtvolumen aufgefüllt und gemischt. Für die Transfektion einer  $\varnothing$  10 cm Schale wurden 20  $\mu$ g Plasmid und 50  $\mu$ l 2,5 M Calciumchloridlösung auf ein Gesamtvolumen von 500  $\mu$ l mit sterilfiltriertem ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Anschließend wurde die Lösung tropfenweise in ein Röhrchen gegeben, welches 300  $\mu$ l ( $\varnothing$  6 cm Schale) oder 500  $\mu$ l ( $\varnothing$  10 cm Schale) 2×HBS Puffer (Kap. 2.10) enthielt und ständig mit einem Vortex-Mixer gemischt wurde. Während einer Inkubation von 10-20 min bei Raumtemperatur bildeten sich Kopräzipitate aus Calciumphosphat und Plasmid-DNA. Die Transfektionslösung wurde durch tropfenweise Zugabe gleichmäßig in der Zellkulturschale verteilt und durch vorsichtiges Schwenken durchmischt. Nach einer Inkubation von 16-24 h unter Zellkulturbedingungen (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) wurden die Zellen mit PBSd gewaschen und in frischem Zellkulturmedium weiterkultiviert.

### 3.10 Infektion humaner embryonaler Lungenfibroblasten mit HCMV

Für die Untersuchung des US28-Rezeptors in HCMV-infizierten Zellen wurden humane embryonale Lungenfibroblasten mit dem HCMV-Stamm AD169 infiziert. Hierzu wurden 0,5 ml eines Lysates AD169-infizierter Zellen (Kap. 2.4) 1:30 bis 1:50 (v/v) in DMEM, 2 % FKS, 10 mM HEPES verdünnt. 3 ml dieser Verdünnung wurden in eine  $\varnothing$  10 cm Zellkulturschale mit humanen embryonalen Lungenfibroblasten (75-90 % Konfluenz) gegeben und durch Schwenken verteilt. Es folgte eine Inkubation für 1 h unter Zellkulturbedingungen (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>), während der die Schale noch dreimal geschwenkt wurde. Nach der Zugabe von 12 ml Standardmedium für die Fibroblastenzellkultur (Kap. 3.8) wurden die Zellen bis zu ihrer weiteren Verwendung weiterkultiviert.

## **3.11 Herstellung monoklonaler Antikörper**

### **3.11.1 Immunisierung von Mäusen**

Für die Immunisierung wurden Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6 verwendet. Als Antigen diente das rekombinante, über eine Affinitätschromatographie aufgereinigte GST-US28<sup>1-51</sup>-Fusionsprotein (Kap. 3.6.4). Das Antigen wurde zusammen mit inkompletem Freundem Adjuvans (IFA) injiziert, welches eine verlangsamte Antigenfreisetzung und zusätzlich eine Aktivierung akzessorischer Zellen bewirkt. 50 µg Fusionsprotein (in 250 µl PBSd) und 250 µl des Adjuvans wurden mit einem Ultraschallgerät für 1 min bei 70 W emulgiert (Wasser-in-Öl Emulsion) und intraperitoneal injiziert. Es folgten zwei weitere intraperitoneale Immunisierungen mit je 50 µg Fusionsprotein (500 µl PBSd/IFA-Emulsion, 1:1, v/v) im Abstand von je zwei Wochen. Nach zwei weiteren Wochen wurde dreimal mit 50 µg Fusionsprotein (400 µl PBSd) ohne Adjuvans im Abstand von zwei Tagen intraperitoneal immunisiert. Zwei Tage nach der letzten Immunisierung wurden die Milzzellen der Maus gewonnen und für eine Fusion mit Myelomzellen verwendet (Kap. 3.11.3).

### **3.11.2 Gewinnung von Maus-Peritonealmakrophagen**

Peritonealmakrophagen entfernen durch Phagozytose tote Zellen und Zellüberreste, die bei der Selektion von Zellen anfallen und sie sezernieren Wachstumsfaktoren, die das Wachstum von Hybridomen fördern können. Aufgrund dieser Eigenschaften wurden 3-5 Tage vor einer Fusion oder einer Klonierung die Makrophagen aus der Bauchhöhle einer Maus mit 5 ml kaltem DMEM, 10% FKS herausgespült. Die Zellen wurden zentrifugiert (200 × g, 5 min) und mit Standard-Zellkulturmedium (Kap. 3.8) auf  $1,5 \times 10^4$  Zellen/ml eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden 100 µl pro Loch einer 96-Loch- oder 1 ml pro Loch einer 24-Loch-Zellkulturplatte gegeben und unter Standard-Kulturbedingungen (Kap. 3.8) kultiviert. Das Medium wurde am Tag vor der Fusion gegen HAT-Medium (Kap.2.9.2) ausgewechselt.

### **3.11.3 Fusion von Milzzellen mit Myelomzellen**

Immunglobulin-produzierende Lymphozyten aus der Maus sind in der Zellkultur nicht überlebensfähig. Um Zellen zu erhalten, die zugleich Antikörper bilden und unbegrenzt teilungsfähig sind, wurden Antikörper-produzierende Mauslymphozyten mit unbegrenzt tei-

lungsfähigen Zellen einer Mausmyelomzelllinie fusioniert. Aus dieser Fusion hervorgehende Zellhybride, die Hybridomzellen, wurden im Prinzip nach der von Köhler und Milstein (1975) beschriebenen Methode hergestellt.

Die Milz einer Maus wurde steril entnommen, in eine Zellkulturschale mit DMEM-Medium gelegt und mit einem sterilen Spritzenkolben vorsichtig homogenisiert. Die Milzzellen wurden von Geweberesten befreit, mit Medium gewaschen und gezählt. X63-Ag8.653-Myelomzellen in der logarithmischen Wachstumsphase wurden ebenso mit DMEM gewaschen und gezählt. Die gleiche Anzahl von Milzzellen und Myelomzellen wurde gemeinsam in einem 50 ml Röhrchen zentrifugiert ( $200 \times g$ , 10 min). Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet durch leichtes Aufklopfen des Röhrchens suspendiert. Das Röhrchen wurde in ein Becherglas mit  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  warmem Wasser gestellt und 1 ml  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  warme Polyethylenglykol 1500-Lösung (50 % w/v in 75 mM HEPES, pH 7,4) unter ständigem Rühren innerhalb von 1 min zu der Zellsuspension gegeben. Die Suspension wurde danach noch eine weitere Minute gerührt. Anschließend wurden 2 ml vorgewärmtes DMEM-Medium innerhalb von 2 min unter Rühren hinzugegeben, dann 20 ml vorgewärmtes Medium zunehmend schneller innerhalb von 5 min. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert ( $200 \times g$ , 10 min), in 240 ml HAT-Medium ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; Kap.2.9.2) resuspendiert und auf 10 Klonierungsplatten (24-Loch Zellkulturplatten mit Peritonealmakrophagen; Kap. 3.11.2) verteilt. Die Klonierungsplatten wurden unter Kulturbedingungen ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) inkubiert.

#### 3.11.4 Selektion und Klonierung von Hybridomzellen

Die meisten nichtfusionierten Milzzellen sterben in der Zellkultur mit der Zeit ab. Nichtfusionierte Myelomzellen sind jedoch in der Lage innerhalb kurzer Zeit die Hybridome zu überwuchern. Um dies zu verhindern, macht man sich einen Defekt der eingesetzten Myelomzellen (X63-Ag8.653) in ihrem Nukleinsäurestoffwechsel zu Nutze. Die Nukleinsäuresynthese kann über einen Haupt- und einen Reservestoffwechselweg erfolgen. Der Hauptweg wird durch den Zusatz von Aminopterin im HAT-Medium inhibiert. Gleichzeitig werden die Zellen durch das HAT-Medium mit den Ausgangsstoffen des Reservestoffwechsels Hypoxanthin und Thymidin versorgt. Den X63-Ag8.653-Myelomzellen fehlt eine funktionelle Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT), die für den Reservestoffwechselweg benötigt wird. Da der Hauptweg durch Aminopterin inhibiert wird und den Myelomzellen aufgrund der defekten HGPRT der Reserveweg nicht zur Verfügung steht,

sterben die nichtfusionierten Myelomzellen in HAT-Medium ab. Nur fusionierte Zellhybride, bei denen der Fusionspartner (Lymphozyten) eine funktionelle HGPRT in die Hybridomzelle einbringt, können überleben.

Zehn bis vierzehn Tage nach einer Fusion (Kap. 3.11.3) waren die Zellklone am Boden einer 24-Loch-Klonierungsplatte deutlich sichtbar. Die Kulturüberstände entsprechender Löcher konnten nun auf die Anwesenheit von spezifischen Antikörpern in einem ELISA (siehe 3.11.5) getestet werden. Die Zellen wurden weiterkultiviert, bis der Boden eines Loches zu 50-80% von Zellen sich ausbreitender Klone bedeckt war. Dann wurden die Zellen von Löchern mit spezifischen Antikörpern im Kulturüberstand durch vorsichtiges Pipettieren gelöst. Die Zellsuspension wurde auf eine Verdünnung von 5 Zellen/ml in HAT-Medium eingestellt. 200  $\mu$ l dieser Zellverdünnung wurden in jedes Loch einer 96-Loch-Zellkulturplatte mit Peritonealmakrophagen (Kap. 3.11.2) gegeben, so daß statistisch eine Zelle pro Loch eingesät wurde. Nach weiteren zehn bis vierzehn Tagen wurden die Kulturüberstände solcher Löcher, in denen nur ein Klon gewachsen war, erneut im ELISA untersucht. Dieser ersten Zellvereinzelung in 96-Loch-Kulturplatten (Klonierung) folgte eine zweite. Sie wurde von Löchern vorgenommen, in deren Kulturüberstand spezifische Antikörper nachweisbar waren (ELISA) und in denen nur ein Zellklon gewachsen war. Nach der zweiten Klonierung wurde davon ausgegangen, daß Hybridomzellen erfolgreich vereinzelt (kloniert) wurden und die von ihnen gebildeten Antikörper somit „monoklonaler“ Herkunft waren. Die Hybridomzellen wurden von den 96-Loch-Klonierungsplatten zunächst auf 24-, dann auf 6-Loch-Zellkulturplatten in HT-Medium (wie HAT-Medium aber ohne das selektionierende Aminopterin) und schließlich in 75 und 150 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen expandiert.

#### **3.11.5 Enzymgekoppelter Immuntest (ELISA) zum Nachweis spezifischer Antikörper**

Der Nachweis von Antikörpern, welche das Fusionsprotein GST-US28<sup>1-51</sup> (Kap. 3.6) erkennen, wurde mit einem enzymgekoppelten Immuntest (ELISA, *enzyme linked immunosorbent assay*) durchgeführt. Um die Antikörper zu identifizieren, die spezifisch für den von US28 stammenden Anteil (US28<sup>1-51</sup>) des Fusionsproteins sind, wurde ein differentieller ELISA durchgeführt. Hierfür wurden alle Proben sowohl auf ihre Fähigkeit das Fusionsprotein GST-US28<sup>1-51</sup>, als auch das GST-Protein zu erkennen getestet. Nur jene Antikörper, die GST-US28<sup>1-51</sup> erkannten, das GST-Protein aber nicht, wurden als US28<sup>1-51</sup>-spezifische Antikörper ausgewählt.

Für den Test wurden die Löcher einer Mikrotiterplatte (96-Löcher, MaxiSorp, Nunc) mit 100  $\mu\text{l}$  einer GST- oder einer Fusionsproteinlösung (3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PBSd) befüllt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 400  $\mu\text{l}$  Waschpuffer (PBSd + 0,1 % Tween 20) pro Loch, wurden freie Bindungsstellen der Plastikwandung mit 200  $\mu\text{l}$  PBS + 1 % BSA (60 min, RT, Schüttler) abgesättigt. Anschließend wurden 100  $\mu\text{l}$  des zu testenden Hybridom-Kulturüberstandes in die Löcher gegeben, 1 h bei RT auf einem Schüttler inkubiert und die Löcher erneut dreimal mit 400  $\mu\text{l}$  Waschpuffer gewaschen. In jedes Loch wurden 100  $\mu\text{l}$  des Peroxidase-gekoppelten Detektionsantikörpers (Ziege anti-Maus-Ig, Southern Biotechnology, 1:4000 in PBSd, v/v) pipettiert, für 1 h bei RT geschüttelt und dreimal mit 400  $\mu\text{l}$  Waschpuffer gewaschen. Abschließend wurden 100  $\mu\text{l}$  einer ABTS-Lösung (Kap. 2.10) in jedes Loch gegeben und bei RT auf einem Schüttler inkubiert. 30 min nach Zugabe der ABTS-Lösung wurde die Absorption bei  $\lambda=405$  nm gegen eine Referenzabsorption von  $\lambda=630$  nm mit einem ELISA-Reader MR5000 (Dynatech) analysiert.

### 3.11.6 Enzymgekoppelter Immuntest zur Bestimmung der Immunglobulin-Klasse

Die Bestimmung der Immunglobulin-Klassen, Subklassen und des Leichtkettentyps der hergestellten monoklonalen Antikörper wurde mit Hilfe des „Maus-Hybridoma-Subtyping Kit“ (Boehringer Mannheim) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 3.11.7 Antikörperreinigung durch Protein A-Affinitätschromatographie

Die Reinigung und Konzentration von US28-spezifischen monoklonalen Antikörpern erfolgte aus gesammelten Hybridom-Kulturüberständen. Hierzu wurde die Bindung der konstanten Region von Maus Immunglobulinen der Klassen IgG 2a und IgG 2b an das Staphylokokken-Protein A genutzt. Die Herstellung von Chromatographiesäulen mit rekombinantem Protein A, welches kovalent an Sepharose gekoppelt war (Amersham Pharmacia), erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Ein Liter Hybridom-Kulturüberstand wurde durch Zentrifugation (3000  $\times$  g, 15 min) von Schwebstoffen gereinigt, auf einen pH von 8,0 titriert (NaOH) und auf eine Protein A-Chromatographiesäule mit 1,5 ml Säulenvolumen geladen. Ein pH von 8,0 wurde gewählt, da die Hybridom-Kulturüberstände FKS und somit auch größere Mengen Rinder-Immunglobuline der Klasse IgG enthielten. Diese haben eine höhere Affinität zu Protein A als Maus IgG-Moleküle, eluieren von Protein A jedoch schon bei ei-

nem pH von 8,0. Die Bindung der monoklonalen Antikörper an die Protein A-Säule fand bei einem Schwerkraft-getriebenen Durchfluß des Kulturüberstandes (0,5-1 ml/min) in 16 bis 24 h bei 4 °C statt. Anschließend wurde die Säule mit 30 ml kaltem PBS pH 7,0 gewaschen, um möglichst alle Rinderserum-Immunglobuline zu entfernen. Die Elution erfolgte mit 10 ml Elutionpuffer (0,2 M Natriumcitrat, pH 3,0) in Fraktionen zu je 0,5 ml, von denen die Proteinkonzentration photometrisch bestimmt wurde (Antikörperkonzentration =  $0,7 \times A_{280}$  mg/ml). Danach wurden die Antikörper enthaltenden Fraktionen mit 1 M Tris pH 8,5 neutralisiert, in einem Dialyseschlauch zusammengeführt und dreimal im Volumenverhältnis 1:1000 in PBSd bei 4 °C umgepuffert. Die aufgereinigten Antikörper-Lösungen wurden in Aliquots bei -20 °C aufbewahrt.

### **3.11.8 Kovalente Kopplung von Biotin an Antikörper**

Ein Teil der aufgereinigten, monoklonalen Antikörper wurde für die weitere Verwendung in Immunblots oder der Immunzytochemie (Kap. 3.18, 3.22) kovalent mit Biotin gekoppelt. Die Kopplung erfolgte in PBSd mit Hilfe des „EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin“ Reagenz (PerbioScience) nach Herstellerangaben.

## **3.12 Metabolische Zellmarkierung mit Radioisotopen**

### **3.12.1 Metabolische Zellmarkierung mit [<sup>35</sup>S]L-Methionin/-Cystein**

$5 \times 10^6$  Zellen wurden in methionin- und cysteinfreiem DMEM-Kulturmedium + 5% FKS (dialysiert gegen 140 mM NaCl-Lösung) gewaschen und 30 min unter Kulturbedingungen (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) inkubiert. Danach wurden die Zellen zentrifugiert (200 × g, 3 min), der Überstand verworfen und die Zellen in 1 ml des methionin-/cysteinfreien Mediums, welchem 200 μCi [<sup>35</sup>S]L-Methionin/-Cystein Mix zugesetzt waren, für 1 h im Brutschrank inkubiert. Vor der weiteren Verwendung der markierten Zellen wurden sie in kaltem PBSd gewaschen.



### 3.12.2 Metabolisches Pulsmarkieren mit [<sup>35</sup>S]L-Methionin/-Cystein (*Pulse-Chase-Experimente*)

$5 \times 10^6$  Zellen wurden in methionin- und cysteinfreiem DMEM-Kulturmedium + 5% FKS (dialysiert gegen 140 mM NaCl-Lösung) gewaschen und 30 min unter Kulturbedingungen (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) inkubiert. Danach wurden sie zentrifugiert (200 × g, 3 min) und in 250 µl des methionin-/cysteinfreien Mediums, welches 200 µCi [<sup>35</sup>S]L-Methionin/-Cystein Mix enthielt, für 10 min unter Kulturbedingungen inkubiert (Puls).  $1 \times 10^6$  Zellen wurden unmittelbar nach dem Pulsmarkieren in eiskaltem PBSd gewaschen und eine Zellextraktion (Kap. 3.13) mit anschließender US28-Immunpräzipitation (Kap. 3.14) durchgeführt. Die verbleibenden Zellen wurden erneut zentrifugiert, in Standardkulturmedium (DMEM, 10% FKS, 2 mM L-Glutamin) aufgenommen und in Ansätzen zu je  $1 \times 10^6$  Zellen weiterkultiviert (*chase*). Zu unterschiedlichen Zeiten wurde ein Ansatz entnommen, in eiskaltem PBSd gewaschen und ebenfalls eine Zellextraktion (Kap. 3.13) mit anschließender US28-Immunpräzipitation (Kap. 3.14) durchgeführt.

### 3.12.3 Metabolische Zellmarkierung mit [<sup>35</sup>S]Natriumsulfat

$2 \times 10^6$  HEK293A Zellen wurden in einer Ø 10 cm Zellkulturschale transient mit US28 oder FLAG-CCR5 transfiziert (Kap. 3.9) und 24 h später mit MEM-Medium ohne Magnesiumsulfat (ICN) gewaschen. Danach wurden die Zellen in 10 ml sulfatfreiem MEM + 5% FKS (dialysiert gegen 140 mM NaCl-Lösung) zusammen mit 500 µCi [<sup>35</sup>S]Natriumsulfat für 16 h unter Kulturbedingungen (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBSd gewaschen, von der Zellkulturschale abgeschabt und zentrifugiert (200 × g, 3 min, 4 °C). Die Zellen wurden anschließend in einer Zellextraktion mit Detergenz lysiert (Kap. 3.13).

### 3.12.4 Metabolisches Markieren von Zellen mit [<sup>32</sup>P]Orthophosphat

HEK293A Zellen wurden 24 h nach einer transienten Transfektion (Kap. 3.9) mit Medium gewaschen und in 6-Loch Zellkulturplatten ( $5 \times 10^5$  Zellen/Loch) ausgesät. 24 h später wurden die Zellen mit HEPES-Puffer (Kap. 2.10) gewaschen und 1 h in phosphat- und serumfreiem DMEM inkubiert (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). Das Medium wurde abgenommen und in jedes Loch 1 ml phosphat- und serumfreies DMEM, welches 200 µCi [<sup>32</sup>P]Orthophosphat/ml

enthielt, gegeben. Nach einer Inkubation (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) von 90 min wurden die Zellen für 1-10 min mit RANTES [10 nM], MIP-1 $\alpha$  [20 nM], Fractalkine [10-200 nM] oder PMA [30 ng/ml] stimuliert oder sie blieben unstimuliert. Anschließend wurden die Zellen auf Eis gestellt und mit eiskaltem PBS gewaschen, bevor eine Zellextraktion (Kap. 3.13) mit Detergenz erfolgte.

Um eine hemmende Wirkung verschiedener Kinase-Inhibitoren oder von Fractalkine auf die Rezeptorphosphorylierung zu untersuchen, wurden die Inhibitoren während der einstündigen „Vor“-Inkubation der Zellen in phosphatfreiem DMEM zugesetzt. Die anschließende [<sup>32</sup>P]-Markierung und eine teilweise erfolgte RANTES-Stimulation wurden ebenfalls in Gegenwart der Inhibitoren oder Fractalkine durchgeführt.

### **3.13 Zellextraktion mit Detergenz**

Alle folgenden Schritte wurden mit eiskalten Puffern im Kühlraum (4 °C) und auf Eis durchgeführt. Zellen in Suspension wurden einmal durch Zentrifugieren (200  $\times$  g, 1 min, 4 °C) und Resuspendieren in eiskaltem PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 1 ml Triton X-100-haltigem Lysepuffer (Kap. 2.10) aufgenommen.

Adhärente Zellen in 6-Loch Zellkulturplatten wurden auf der Platte einmal mit eiskaltem PBSd gewaschen. Nach Zugabe von 1 ml Triton X-100-haltigem Lysepuffer wurden die Zellen mit einem Zellschaber vollständig vom Plattenboden abgelöst und die Zellsuspension nach mehrmaligem Pipettieren in ein 1,5 ml Eppendorf-Reagiergefäß überführt.

Die Zellyse erfolgte während 45 min Inkubation unter langsamer Rotation. Eine anschließende Zentrifugation (13.000  $\times$  g, 10 min, 4 °C) diente der Entfernung der Zellkerne und anderer unlöslicher Bestandteile vom Solubilisat. Der Zentrifugationsüberstand (Zellsolubilisat) wurde sofort weiterverarbeitet.

### **3.14 Immunpräzipitation**

Für die Immunpräzipitation von Proteinen aus Zellsolubilisaten wurden Protein A oder Protein G-Sepharose-Kügelchen mit spezifischen Antikörpern beladen (siehe nächster Absatz). Das Zellsolubilisat (Kap. 3.13) wurde zweimal mit 100  $\mu$ l Pansorbin<sup>®</sup> und 5  $\mu$ l norma-

lem Mausserum inkubiert (30 min, 4 °C, Rotation), um unspezifisch bindende Moleküle zu entfernen. Es folgte die Inkubation der vorgereinigten Zellsolubilisate mit den antikörperbeladenen Protein A oder -G Kügelchen für 2 h bei 4 °C unter Rotation. Anschließend wurden die Kügelchen dreimal mit eisgekühltem Lysepuffer gewaschen und in 100 µl SDS-PAGE-Probenpuffer aufgenommen. Die derart vorbereiteten Proben wurden einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen.

Beladung von Protein A oder Protein G-Sepharose-Kügelchen mit Antikörpern (60 min, 4 °C, Rotation):

US28-spezifische mAk

Tub-6: 500 µl Hybridom-Kulturüberstand an 10 µl Protein A Sepharose-Kügelchen / Probe

Tub-45: 250 µl Hybridom-Kulturüberstand an 10 µl Protein A Sepharose-Kügelchen / Probe

FLAG-Sequenz-spezifische mAk

M2 oder M5 (Sigma): 10 µg des aufgereinigten mAk an 10 µl Protein G Sepharose-Kügelchen in 1 ml Lysepuffer / Probe

Polyklonale Kaninchen-Ak, spezifisch für Humane MHC I schwere Kette

dHC70: 10 µl Serum an 10 µl Protein G Sepharose-Kügelchen in 1 ml Lysepuffer / Probe

humanes CCR7-spezifische mAk

3D12: 1 ml Hybridom-Kulturüberstand an 10 µl Protein G Sepharose-Kügelchen / Probe

Im Anschluß an die Inkubation mit Antikörpern wurden die Kügelchen zweimal mit Lysepuffer gewaschen.

### **3.15 Quantifizierung des biosynthetischen Einbaus radioaktivmarkierter Aminosäuren**

Um die biosynthetische Einbaurate von [<sup>35</sup>S]L-Methionin und Cystein durch metabolisch markierte Zellen zu bestimmen, wurden die zellulären Proteine mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt und die Aktivität in einem Betazähler bestimmt. Hierzu wurden von einer Zellextraktion mit Detergenz je 10 µl Zellsolubilisat auf 3 Filterpapierstückchen (1×1cm, Whatman 3MM) gegeben. Bevor die Solubilisate getrocknet waren, wurden die Filterpapiere dreimal für 10 min in 5 % TCA/ddH<sub>2</sub>O (w/v) bei RT geschwenkt. Abschließend wurden die Filterpapiere 3 min in 100 % Ethanol getränkt, luftgetrocknet, in Szintillationsröhrchen mit 5 ml Szintillationflüssigkeit aufgenommen (Rotiszint<sup>®</sup> eco plus) und in einem Betazähler (Canberra-Packard) analysiert. Die aus der Zählung gewonnenen relativen Einbauraten an radioaktivmarkierten Aminosäuren dienten der Berechnung von Probenmengen für die SDS-PAGE (Normalisierung).

## 3.16 Untersuchung der Proteinglykosylierung

### 3.16.1 Inhibition der *N*-Glykosylierung mit Tunicamycin

Die *N*-Glykosylierung von Proteinen erfolgt im endoplasmatischen Retikulum durch Übertragung eines *Core*-Oligosaccharides von Dolicholphosphat an einen Asparaginrest des Proteins. Der erste Schritt der *Core*-Oligosaccharidsynthese ist die Addition von *N*-Acetylglucosamin an Dolicholphosphat. Dieser initiale Schritt wird durch Tunicamycin, einem hydrophoben Analogon des *N*-Acetylglucosamins, gehemmt, wodurch die *N*-Glykosylierung von Proteinen unterbunden wird. HEK293A Zellen wurden 24 h nach der Transfektion mit US28 oder CCR7 mit Zellkulturmedium gewaschen. Jeweils zwei Ansätze wurden für 1,5 h in frischem Zellkulturmedium entweder mit oder ohne 10  $\mu\text{g/ml}$  Tunicamycin weiterkultiviert. Die Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von Tunicamycin (10  $\mu\text{g/ml}$ ) metabolisch mit [ $^{35}\text{S}$ ]Methionin/Cystein markiert (Kap. 3.12.1). Es folgte eine Zellextraktion mit Detergenz (Kap. 3.13) und eine Immunpräzipitation der Chemokinrezeptoren aus den Zellsolubilisaten (Kap. 3.14). Die immunpräzipitierten Rezeptoren wurden in SDS-PAGE Probenpuffer aufgenommen und die Probenmengen auf die zuvor bestimmte zelluläre  $^{35}\text{S}$ -Einbaurate (Kap. 3.15) angeglichen. Die anschließende SDS-PAGE wurde in einer Autoradiographie analysiert. Wurde die *N*-Glykosylierung eines Rezeptors durch Tunicamycin verhindert, so zeigte dieser eine andere Lage in dem SDS-Polyacrylamidgel als der glykosylierte Rezeptor aus unbehandelten Kontrollzellen.

### 3.16.2 Enzymatische Hydrolyse von *N*-Glykosylierungen mit Endoglykosidase H

Endoglykosidase H hydrolysiert die  $\beta$ -1,4-glykosidische Bindung der beiden *N*-Acetylglucosamin-Reste von *N*-glykosidisch gebundenen *Core*-Oligosacchariden. Mit Hilfe der Endoglykosidase H konnten die *N*-Glykosylierungen von Proteinen im Anschluß an eine Immunpräzipitation abgespalten werden. *N*-glykosylierte Proteine weisen nach einer Oligosaccharidabspaltung durch die Endoglykosidase eine andere Lage im SDS-Polyacrylamidgel auf, als Proteine aus Kontrollansätzen (glykosyliert). Rezeptor transfizierte HEK293A Zellen wurden metabolisch mit [ $^{35}\text{S}$ ]L-Methionin/-Cystein markiert (Kap. 3.12.1). Es erfolgte eine Zellextraktion mit Detergenz (Kap. 3.13) und eine Immunpräzipitation der Chemokinrezeptoren aus den Zellsolubilisaten (3.14). Die an Protein A oder Protein G Sepharosekügelchen immobilisierten Rezeptoren wurden viermal mit Lysepuffer gewaschen. Anschließend wurde

eine Hydrolyse von *N*-glykosidisch gebundenen Oligosacchariden mit Hilfe der Endoglykosidase H (Endo  $H_f$ ) und mitgelieferter Puffer nach Herstellerangaben (NEB) durchgeführt. Hierzu wurden die Sepharosekügelchen zunächst für 7 min bei 95 °C in 55  $\mu$ l Denaturierungspuffer (0,5 % SDS, 1%  $\beta$ -Mercaptoethanol) inkubiert. Nach einer Zentrifugation (2 min, 13000  $\times$  g) wurde der Überstand auf zwei 26  $\mu$ l Ansätze aufgeteilt, denen jeweils 3  $\mu$ l Puffer G5 (50 mM Natriumcitrat, pH 5,5) und 1  $\mu$ l Endo  $H_f$  (1000 U) oder 1  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O zugegeben wurde. Die Ansätze wurden 90 min bei 37 °C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 30  $\mu$ l 2 $\times$  Protein-Probenpuffer (Kap. 2.10) beendet. Nach einer Normalisierung der Probenmenge (Kap. 3.15), wurden die Rezeptoren in einer SDS-PAGE (Kap. 3.17) aufgetrennt und in einer Autoradiographie analysiert.

### 3.16.3 Inhibition der *O*-Glykosylierung durch BADG

Benzyl-2-acetamido-2-deoxy- $\alpha$ -D-Galaktopyranosid (BADG) ist ein Substratanalogon für die *N*-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminyltransferase und hemmt die 2,3(O)-Sialyltransferase. Der Einsatz von BADG in der Zellkultur verhindert die vollständige, postrtranslationale *O*-Glykosylierung von Proteinen. 24 h nach einer Transfektion mit US28 wurden HEK293A Zellen mit Kulturmedium (Kap. 3.8) gewaschen und in zwei Ansätzen für 24 h in frischem Medium entweder mit oder ohne 4 mM BADG weiterkultiviert. Die Zellen wurden erneut gewaschen und in Gegenwart oder Abwesenheit von BADG (4 mM) metabolisch mit [<sup>35</sup>S]L-Methionin/-Cystein markiert (Kap. 3.12.1). Es erfolgte eine Zellextraktion mit Detergenz (Kap. 3.13) und eine Immunpräzipitation von US28 aus den Zellsolubilisaten (Kap. 3.14). Die Probenmengen wurden entsprechend der eingebauten Radioaktivitätsmenge angeglichen (Kap. 3.15) und die Rezeptoren in einer SDS-PAGE mit anschließender Autoradiographie analysiert.

## 3.17 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde im Wesentlichen nach der von Laemmli (1970) beschriebenen Methode in einem diskontinuierlichen Puffersystem mit Trenngelen von 10% oder 13% Acrylamidgehalt (Kap. 2.10) durchgeführt. Chemokinrezeptoren enthaltende Proben wurden in Probenpuffer aufgenommen und vor dem Gelauftrag 30 min bei RT inkubiert. Alle anderen

Proben wurden vor dem Gelauftrag in Probenpuffer für 5 min auf 95 °C erhitzt und anschließend auf Eis gekühlt. Zur Fokussierung der Proben wurde ein 3,5%-iges Sammelgel benutzt. Die Elektrophorese eines 13×16 cm Geles erfolgte bei konstanter Spannung (50 V) in ca. 16 h bei RT.

Zur Molekulargewichtsabschätzung dienten folgende Standard-Proteinmischungen:

SDS-6H (Sigma): Myosin, 205 kDa;  $\beta$ -Galaktosidase, 116 kDa; Phosphorylase b, 97,4 kDa; Rinderserumalbumin, 66 kDa; Hühnereialbumin, 45 kDa und Carboanhydrase, 29 kDa.

Dalton Mark VII-L™ (Sigma): Rinderserumalbumin, 66 kDa; Hühnereialbumin, 45 kDa; Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, 36 kDa; Carboanhydrase, 29 kDa; Trypsinogen, 24 kDa; Sojabohnen-Trypsininhibitor, 20,1 kDa;  $\alpha$ -Lactalbumin, 14,2 kDa.

Prestained SDS-PAGE Standard-Proteinmischung (BioRad): Chargenabhängige Molekulargewichte.

### 3.17.1 Autoradiographie

Zur Anfärbung der Molekulargewichtstandards wurden die Gele nach der Elektrophorese zunächst in Coomassie-Färbelösung gefärbt und fixiert. Anschließend wurden die Gele unter stündlichem Wechseln der Entfärbelösung inkubiert, bis der Gelhintergrund transparent wurde und abschließend dreimal für 20 min mit Wasser gewaschen. Entfärbte Gele mit  $^{32}\text{P}$ -markierten Proben wurden auf Filterpapier (Whatman 3MM) gelegt, mit Haushaltsfolie und einem weiteren Bogen Filterpapier abgedeckt und unter Vakuum getrocknet (90 min, 75 °C). Bei Gelen mit  $^{35}\text{S}$ -markierten Proben wurde nach der Entfärbung dreimal 20 min mit Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Gel 1 h in einer 1 M Natriumsalicylat-Lösung inkubiert und nochmals kurz (< 3 min) in Wasser gewaschen, bevor das Gel wie beschrieben getrocknet wurde. Radioaktiv markierte Proteinbanden wurden durch Exposition von Röntgenfilmen auf den getrockneten Gelen (1-30 Tage, -80 °C) und anschließender fotografischer Entwicklung sichtbar gemacht.

## 3.18 Immunblots

### 3.18.1 Elektrotransfer von Proteinen auf PVDF- und Nitrozellulosemembranen (Western-Blot)

Der Transfer von Proteinen auf PVDF- und Nitrozellulosemembranen erfolgte mit einer „Trans-Blot® SD“ Apparatur (BioRad) nach dem *Semi-dry*-Verfahren. Hierzu wurde das Polyacrylamidgel direkt nach beendeter SDS-PAGE (Kap. 3.17) für 15 min in Transferpuffer geschüttelt und sechs Filterpapiere (Whatman 3 MM) und ein Membranstück in der Größe des Geles ausgeschnitten. Auf die Anode der horizontalen Blotapparatur wurde ein Stapel aus drei in Transferpuffer getränkten Filterpapieren gelegt. Darauf folgte die für 3 min in Transferpuffer getauchte Membran (PVDF-Membranen wurden zuvor 1 min in Methanol aktiviert), das Transferpuffer-äquilibrierte SDS-Gel und schließlich noch einmal drei Transferpuffergetränkte Filterpapiere. Alle Lagen wurden luftblasenfrei aufeinandergelegt. Nach dem Auflegen der Kathode wurde der Elektrotransfer von 13×16 cm Gelen für 1 h bei konstant 20 V durchgeführt.

### 3.18.2 Immunfärbung von Chemokinrezeptoren in Western-Blots

Bei allen Inkubationsschritten wurde die Membran langsam bei RT geschüttelt. Nach dem Elektrotransfer (Kap. 3.18.1) wurde die PVDF-Membran für 30 min in PBST 5 % Milchpulver (w/v) abgesättigt. Nach dreimaligem Waschen mit PBST für jeweils 5 min, wurde die Membran 1 h mit dem rezeptorspezifischem Primärantikörper (Hybridom-Kulturüberstände, 1:3-1:10 in PBST 5 % Milchpulver, w/v) inkubiert. Anschließend wurden die Membranen dreimal 5 min in PBST gewaschen und 1 h mit Peroxidase-gekoppeltem Ziege anti-Maus Antikörper (Southern Biotechnology; 1:8000 in PBST 5 % Milchpulver, w/v) geschüttelt. Vor der Durchführung eines Chemilumineszenz-Nachweises (Kap. 3.18.4) wurden die Membranen viermal 10 min in PBST gewaschen.

### 3.18.3 Immunfärbung von Mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPK) in Western-Blots

Die Immunfärbung von MAPK erfolgte mit (Phospho-)MAPK-spezifischen Antikörpern nach Herstellerangaben (Cell Signaling, NEB). Zusammengefaßt; die verwendeten Ni-

trozellulosemembranen wurden nach dem Elektrotransfer (Kap. 3.18.1) 1h in TBST, 5 % Milchpulver (w/v) bei RT langsam geschüttelt, danach dreimal 5 min mit TBST (2.10) gewaschen und über Nacht mit Phospho-MAPK-spezifischen Antikörpern (1:1000 in TBST, 5 % BSA, w/v) bei 4 °C langsam geschüttelt. Anschließend wurden die Membranen dreimal 5 min in TBST gewaschen und 1 h mit Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper (1:1000 in TBST 5 % Milchpulver, w/v) bei RT geschüttelt. Vor der Durchführung eines Chemilumineszenz-Nachweises (Kap. 3.18.4) wurden die Membranen viermal 10 min in TBST (Schütteltisch) gewaschen.

Um zu kontrollieren, ob in allen Gelbahnen die gleiche Menge Protein aufgetragen wurde, folgte eine zweite Immunfärbung der Blots. Zunächst wurden die gebundenen Nachweisantikörper nach der sogenannten „*Stripping*“-Methode wieder von der Membran entfernt. Hierzu wurde die Membran nach dem Chemilumineszenz-Nachweis mit TBST gespült, für 15 min in 0,1 M Glycin pH 2,7 inkubiert (RT, Schütteltisch) und wieder mit ddH<sub>2</sub>O gespült. Es folgte eine Immunfärbung mit Antikörpern, die sowohl die phosphorylierten als auch die nicht phosphorylierten Formen der MAPK-1 und -2 erkannten und ein anschließender Chemilumineszenz-Nachweis.

#### **3.18.4 Chemilumineszenz-Nachweis**

Der Chemilumineszenz-Nachweis diente zum Nachweis von Proteinbanden in Immunblots, die mit Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörpern durchgeführt wurden. Er wurde mit Hilfe der „ECL“-Reagenzien (Amersham) nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden 0,1 ml eines 1:1 Gemisches (v/v) der Reagenzien 1 und 2 pro cm<sup>2</sup> Membran eingesetzt. Das Lösungsgemisch wurde 1 min auf der Membran inkubiert, abtropfen gelassen und die Membran zwischen zwei Klarsichtfolien eingeschlagen. Anschließend wurde ein Röntgenfilm in einer Filmkassette für 5 Sekunden bis 15 min auf der eingeschlagenen Membran exponiert und danach entwickelt.

#### **3.19 Quantitative Analyse von Proteinbanden in Polyacrylamidgelen**

Die Quantifizierung von Gelbanden wurde mit dem Computerprogramm „Tina2.0“ (Raytest) durchgeführt. Für die densitometrische Auswertung galt es sowohl bei *Imager* Platten (radioaktive Proben), als auch bei Röntgenfilmen (Chemilumineszenz, Immunblots; Kap.



3.18.3) eine angemessene Expositionsdauer einzuhalten. Bei zu langer Exposition treten die Färbung des Röntgenfilms sowie die Signal-Detektion der *Imager* Platte in eine „Sättigung“ und lassen dann keine Bestimmung der relativen Protein- bzw. Radioaktivitätsmenge zu.

Zur quantitativen Analyse radioaktiver Proben erfolgte die Exposition getrockneter SDS-PAGE Gele für 6-48 Stunden auf einer *Imager* Platte. Diese wurde mit einem „Fujix BAS 2000 *Image Analyzer*“ (Fuji) analysiert und die relativen Radioaktivitätsmengen einzelner Banden mit dem Computerprogramm „Tina2.0“ bestimmt. Um die Proteinmengen einzelner Banden eines Immunblots zu bestimmen, wurden die Röntgenfilme (Chemilumineszenz-Nachweis) mit einem Durchlichtscanner eingelesen und ebenfalls mit dem Programm „Tina 2.0“ ausgewertet.

Bei der Untersuchung von Rezeptor-Phosphorylierungen mittels metabolischer [ $^{32}\text{P}$ ]-Zellmarkierung wurden stets zwei SDS-PAGE Gele vorbereitet. Nach der Immunpräzipitation des Rezeptors aus Zellsolubilisaten wurden 75 % jeder Probe auf das erste Gel aufgetragen und später in einer Autoradiographie mit dem „Fujix BAS 2000 *Image Analyzer*“ analysiert. Die restlichen 25 % jeder Probe wurden in einem zweiten Gel aufgetrennt und ein Immunblot durchgeführt. Dieser diente anschließend einer relativen Proteinmengenbestimmung des Rezeptors in jeder Gelbahn. Auf diese Weise konnten die Phosphorylierungswerte (Gel 1) auf die geladenen Proteinmengen (Gel 2) normalisiert werden.

## 3.20 Bestimmung phosphorylierter Aminosäuren

### 3.20.1 Proteinhydrolyse

US28 wurde nach einer metabolischen Zellmarkierung mit [ $^{32}\text{P}$ ]-Orthophosphat (Kap. 3.12.4) immunpräzipitiert (Kap. 3.14) und in einer SDS-PAGE (Kap. 3.17) aufgetrennt. Die Bande des  $^{32}\text{P}$ -markierten US28 wurde aus dem getrockneten Gel der SDS-PAGE ausgeschnitten, nachdem die genaue Lage durch eine Autoradiographie bestimmt worden war. Das Gelstück wurde in 500  $\mu\text{l}$  Elutionspuffer (Kap. 2.10), dem 10  $\mu\text{g}$  BSA (10  $\mu\text{l}$  Stammlösung: 1 mg BSA/ml Elutionspuffer, w/v) zugegeben wurde, gequollen. Es wurde durch gründliches Pottern mazeriert und über Nacht bei 4 °C gerüttelt. Die Probe wurde in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt, welches ein mit einem Glaswollepfropf verstopftes Loch (Kanüledurchstich) im Boden besaß. Dieses wurde in ein 2,0 ml Reaktionsgefäß gestellt und 30 min bei 13000  $\times$  g zentrifugiert. Der aufgefangene Durchlauf wurde in ein frisches Reaktionsgefäß

überführt, weitere 10  $\mu\text{g}$  BSA hinzugefügt und auf einen Gehalt von 20 % Trichloressigsäure (Stammlösung: 100 % Trichloressigsäure in ddH<sub>2</sub>O, w/v) gebracht. Nach einer Stunde Inkubation bei 4 °C wurde 15 min bei 13000  $\times$  g zentrifugiert und das Pellet je einmal mit Diethylether/Ethanol (30/70, v/v) und reinem Diethylether gewaschen. Das gefällte Proteinpellet wurde in 30  $\mu\text{l}$  6 N HCl aufgenommen und für 2 h bei 110 °C hydrolysiert. Die Probe wurde in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 10  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O resuspendiert.

### 3.20.2 Zweidimensionale Dünnschicht-Elektrophorese

Auf einer Zellulose beschichteten Glasplatte (Merck) wurden 4  $\mu\text{l}$  des Proteinhydrolysates (Kap. 3.20.1) in Schritten zu je 0,5  $\mu\text{l}$  aufgetragen. Zuletzt wurden noch 0,5  $\mu\text{l}$  einer Standardlösung aufgetragen, die jeweils 1 mg/ml O-Phospho-L-Serin, -Threonin und -Tyrosin enthielt (in ddH<sub>2</sub>O, w/v). Die Zelluloseoberfläche der Glasplatte wurde mit Elektrophoresepuffer pH 1,9 (Ameisensäure/Essigsäure/ddH<sub>2</sub>O, 50/156/1794, v/v/v) angefeuchtet. Die Elektrophorese im pH 1,9 Puffer erfolgte unter Wasserkühlung bei 1000 V für 45 min in einer Multiphor II (Amersham Pharmacia) Elektrophoresekammer. Anschließend wurde die Platte an der Luft getrocknet und mit Elektrophoresepuffer pH 3,5 (Essigsäure/Pyridin/100mM EDTA/ddH<sub>2</sub>O, 100/10/10/1880, v/v/v/v) angefeuchtet. Die folgende Elektrophorese im pH 3,5 Puffer erfolgte im rechten Winkel zum Verlauf der ersten Elektrophorese bei 1000 V für 30 min unter Wasserkühlung. Danach wurde die Platte 30 min bei 70 °C getrocknet und zum Nachweis der Aminosäuren mit Ninhydrin-Reagenz (Sigma) besprüht. Nach 10-minütigem Erhitzen auf 70 °C färbten sich die phosphorylierten Referenzamino-säuren an. Anschließend erfolgte die Auswertung durch eine Autoradiographie (Kap. 3.17.1).

### 3.21 Durchflußzytometrie (FACS-Analysen)

Die adhären-t wachsenden Zellen wurden einmal mit PBSd gewaschen und mit PBSd, 2mM EDTA unter vorsichtigem Pipettieren von der Zellkulturplatte abgelöst. Die Zellen wurden zentrifugiert (200  $\times$  g, 3 min, 4 °C) und einmal in eiskaltem PBSd durch Resuspendieren und Zentrifugieren gewaschen. Um intrazelluläre Proteine nachweisen zu können, mußten die Zellen zunächst fixiert und permeabilisiert werden (Kap. 3.21.1). Für den Nachweis von Zelloberflächenproteinen wurden die Zellen in eiskaltem FACS-Puffer (PBSd, 0,5%

BSA, 0,01% NaN<sub>3</sub>) gewaschen und anschließend eine Immunfluoreszenzfärbung (Kap. 3.21.2) durchgeführt.

### 3.21.1 Fixierung und Digitonin-Permeabilisierung

1-5×10<sup>6</sup> gewaschene Zellen wurden in 0,5-1 ml eiskalter Paraformaldehyd Lösung (5 % Paraformaldehyd/PBSd, w/v) aufgenommen und 15 min auf Eis fixiert. Danach wurden die Zellen zentrifugiert (200 × g, 3 min, 4 °C) und zweimal in PBSd bei RT gewaschen. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte während einer 7-minütigen Inkubation mit 0,0025% Digitonin/PBSd (w/v) bei RT. Nach 3 min Zentrifugation (200 × g, 4 °C) wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem FACS-Puffer gewaschen.

### 3.21.2 Immunfluoreszenzfärbung und Durchflußzytometrie

Intakte oder permeabilisierte Zellen (Kap. 3.21.1) wurden zentrifugiert und in 50 µl einer Antikörperlösung aufgenommen, die spezifische Antikörper für das nachzuweisende Protein enthielt. Die Zellen wurden in dieser Antikörperlösung (Hybridom Kulturüberstände/FACS-Puffer, 1:1, v/v) 1 h auf Eis inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit eiskaltem FACS-Puffer erfolgte eine Inkubation mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten zweiten Antikörper für 30 min auf Eis (in FACS-Puffer). Dieser zweite Antikörper war spezifisch für den Immunglobulintyp (Spezies und Ig-Klasse) des ersten Antikörpers. Die Zellen wurden dreimal in FACS-Puffer gewaschen, in PBSd aufgenommen und bis zur Durchflußzytometrie auf Eis stehen gelassen.

Für die sichere Unterscheidung, ob ein Protein auf der Zelloberfläche oder intrazellulär lokalisiert war, wurden intakte Zellen (nicht permeabilisiert) mit Fluorescein-gekoppelten zweiten Antikörpern gefärbt und direkt vor der Messung zusätzlich mit Propidiumjodid [4 µM] gefärbt. Bei Zellen mit gestörter Integrität der Zellmembran dringt der Propidiumjodid-Farbstoff in die Zelle ein und färbt die Kern-DNA an. Die Propidiumjodid-gefärbten Zellen wurden von der Auswertung der Zelloberflächenexpression ausgeschlossen. Die Zellen wurden mit den Durchflußzytometern „FACSCalibur“ oder „FACScan“ (Becton-Dickinson) analysiert. Die Auswertung der Meßdaten erfolgte mit dem Programm „WinList 3.0“ (Verity).

## 3.22 Immunzytochemie und Immunfluoreszenzmikroskopie

HEK293A Zellen wurden mit Chemokinrezeptoren nach der Calciumphosphat-Methode (Kap. 3.9) transient transfiziert, 24 h später mit Medium gewaschen und auf Histo-Bond® Objektträger ausgesät. Die immunzytochemischen Färbungen von Chemokinrezeptoren wurden 48 h nach der Transfektion durchgeführt. Zwischen allen Inkubationsschritten wurde dreimal für 5 min mit PBSd bei RT gewaschen.

### Färbung von Zelloberflächenproteinen

Die Zellen wurden nach einmaligem Waschen mit rezeptorspezifischen Antikörpern 30 min auf Eis inkubiert. Hierzu wurden entweder unverdünnte Hybridomzell-Kulturüberstände oder 10 µg/ml PBSd des aufgereinigten, FLAG-Epitop-spezifischen mAk M2 (Sigma) verwendet. Anschließend wurden die Zellen mit 5 % Paraformaldehyd/PBSd (w/v) für 20 min bei RT fixiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit PBSd + 3 % Rattenserum (US28 und FLAG-CCR5) oder 3 % Mausserum (CXCR5) für 30 min, RT abgesättigt.

### Färbung von intrazellulären Proteinen

Bei der intrazellulären Färbung wurden die Zellen nach dem Waschen zunächst 20 min mit 5 % Paraformaldehyd/PBSd bei RT fixiert. Danach wurde mit 0,1 % Triton X-100/PBSd (v/v) für 15 min bei RT permeabilisiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit PBSd + 3 % Rattenserum (US28 und FLAG-CCR5) oder 3 % Mausserum (CXCR5) für 30 min bei RT abgesättigt. Danach erfolgte eine Inkubation mit rezeptorspezifischen Antikörpern (siehe Zelloberflächenfärbung) für 1 h bei RT.

Sowohl bei der Oberflächenfärbung, als auch der intrazellulären Färbung folgte eine Inkubation mit Biotin-gekoppelten Sekundärantikörpern (Kap. 2.7) für 1 h bei RT. Anschließend wurden die Präparate 30 min mit Streptavidin-gekoppeltem Alexa Fluor® 568 (Molecular Probes) und DAPI [10 µg/ml] inkubiert. Nach viermal Waschen (5 min, PBSd) wurden Deckgläschen mit Mowiolösung (Kap. 2.10) auf den feuchten Präparaten fixiert und über Nacht bei RT inkubiert. Die Auswertung erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop DM IRBE (Leica). Bilder wurden mit einer digitalen Kamera (AxioCam™, Zeiss) aufgenommen und mit dem Programm „Axiovision2.0“ (Zeiss) bearbeitet.

### 3.23 Bestimmung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung (Luziferase-Assay)

Die Messung der NF- $\kappa$ B-abhängigen Transkription wurde mit Hilfe des Luziferase-Reporter Plasmides „6NF- $\kappa$ Btkluc.neo“ (Bergmann *et al.*, 1998) durchgeführt. Das Plasmid enthält oberhalb des Luziferasegens insgesamt sechs Wiederholungen der NF- $\kappa$ B-Bindungssequenz (GGGACTTTCC) und eine minimale Thymidinkinasepromotor-Sequenz. Nach einer Aktivierung vermittelt NF- $\kappa$ B die Transkription des Luziferasegens, deren Aktivität mit dem „Dual-Luciferase reporter assay system“ (Promega) gemessen wurde. Als interne Kontrolle für veränderliche Versuchsbedingungen diente die Expression der *Renilla*-Luziferase, die ebenfalls unter der Transkriptionskontrolle eines Thymidinkinasepromotors stand (pRL-TK Plasmid, Promega).

HEK-293A Zellen wurden in 6-Lochplatten ausgesät und am folgenden Tag, bei einer Konfluenz von ca. 50 % mit folgenden Plasmiden transfiziert (Calciumphosphat-Methode, 3.9):

6NF- $\kappa$ Btkluc.neo	100 ng/Loch
pRL-TK	50 ng/Loch
pcDNA3.1(-) mit/ohne Rezeptor-cDNA	100 ng/Loch

Nach 24 h wurden die Zellen in serumfreien Medium gewaschen und für 6 h mit oder ohne TNF- $\alpha$  [10 ng/ml] oder Fractalkine [100 nM] in serumfreien Medium unter Standardkulturbedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBSd gewaschen und in 250  $\mu$ l/Loch „Passive Lysis Buffer“ (Promega) lysiert. Jeweils 20  $\mu$ l der Zellysate wurden zur Messung der Luciferaseaktivitäten in einem Luminat LB 9507 (Berthold) eingesetzt. Die Messung der NF- $\kappa$ B-abhängigen Luciferase (RLU1) wurde in Gegenwart des „Luciferase Assay Substrate“ (Promega) bestimmt und durch die Zugabe des „Stop&Glo“-Reagenz (Promega) beendet. In dessen Gegenwart wurde in einer zweiten Messung die Aktivität der Kontroll-Luciferase (*Renilla*) analysiert (RLU2). Die spezifische, NF- $\kappa$ B-abhängige Aktivität ergab sich aus dem Quotienten RLU1/RLU2.

### 3.24 Internalisierung von [<sup>125</sup>I]-markiertem RANTES

HEK293A Zellen wurden 24 h nach einer transienten Transfektion (Kap. 3.9) gewaschen und in einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen pro Loch in einer 24-Loch-Zellkulturplatte ausgesät. 24 h später wurden die Zellen in eiskaltem Bindungsmedium (BM; Kap. 2.9.2) gewa-

schen und nach der Zugabe von 250  $\mu\text{l}$  kaltem BM, das 125 pM  $^{125}\text{I}$ -RANTES enthielt, für 2 h bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden auf Eis gestellt, das Medium entfernt und nicht gebundener Ligand durch zweimaliges Waschen mit kaltem BM entfernt. Anschließend wurde warmes BM zu den Zellen gegeben (außer bei den Zellen für den Zeitpunkt  $t=0$  min) und die Internalisierung von Zelloberflächen-gebundenem  $^{125}\text{I}$ -RANTES bei 37 °C und normaler Atmosphärenluft ermöglicht. Nach 10 oder 60 min Inkubation bei 37 °C wurden die Platten zur Beendigung des Internalisierungsvorgangs auf Eis gestellt und mit eiskaltem BM gewaschen, um nicht gebundenes  $^{125}\text{I}$ -RANTES zu entfernen. Für jeden Zeitpunkt waren vier Löcher vorgesehen. Zwei Löcher wurden erneut zweimal mit kaltem BM gewaschen und die Zellen in 400  $\mu\text{l}$  0,2 M NaOH lysiert. Von diesen Lysaten wurde der Wert für die „gesamte zellassoziierte Aktivität“ bestimmt. In den verbliebenen 2 Löchern wurde zweimal für 3 min mit eiskühlem, saurem Medium (Kap. 2.9.2) gewaschen, um Zelloberflächen-gebundenes  $^{125}\text{I}$ -RANTES zu entfernen. Die Zellen wurden mit BM gewaschen und in 400  $\mu\text{l}$  0,2 M NaOH lysiert („Säure-resistente Aktivität“). Alle Zellysate wurden in 0,5 ml Reaktionsgefäße überführt und in einem Gammazähler (Berthold) analysiert. Die Internalisierung wurde als der prozentuale Anteil der „Säure-resistenten Aktivität“ (internalisiert) an der „gesamten zellassoziierten Aktivität“ nach vorherigem Abzug der Hintergrund-Aktivität zum Zeitpunkt  $t=0$  min berechnet.