

4. MATERIAL UND METHODEN

Alle in diesem Kapitel nicht näher beschriebenen allgemeinen molekularbiologischen Methoden, wie z.B. Restriktionen, Ligationen und Ethidiumbromid-Gele, wurden nach Sambrook et al. (1989) oder Sambrook und Russel (2001) durchgeführt. Bei den verwendeten Kits wurde nach den Angaben des Herstellers vorgegangen.

4.1. Materialien

4.1.1. Geräte

Mikroskope:	Axiovert 25, Zeiss TS100, Nikon Axiovert 40 CFL, Zeiss
Inkubatoren:	BBD 6220, Heraeus unbegaster Bakterien-Inkubator, New Brunswick Scientific G25 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific
Stickstofftank:	Biosafe MD, Cryotherm
Sterilbänke:	Hera Safe, Heraeus
Zentrifugen:	5810R, Eppendorf 5415D, Eppendorf 5417R, Eppendorf 3K30, Sigma J2-21, Beckman OptimaL-70K, Beckman
Thermoblöcke:	ThermoStat plus, Eppendorf Thermomixer Comfort, Eppendorf
Wiegeschüttler:	3011, GFL
Vortexer:	L46, Labinco VV3, VWR

MATERIAL UND METHODEN

Elektrophorese-Kammern:	Agagel mini, Biometra Agagel maxi, Biometra Minigel-Twin, Biometra Maxi-Vertikal Doppel-Kammer, Biorad
UV-Transilluminator:	Lumi-Imager F1, Roche
Power-Supplies:	Power Pac 300, Biorad EPS 301, Amersham
Blotting-Apparatur:	Fastblot B64, Biometra
Geltrockner:	Gel dryer 583, Biorad
Thermocycler:	T1 und T3000, Biometra
UV-Crosslinker:	CL-1000, UVP
Hybridisierungsöfen:	OV5, Biometra
Luciferase-Reader:	MicroLumat LB96P (Berthold)
Sequenzierer:	ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer, Applied Biosystems

4.1.2. Chemikalien und Biochemikalien

Actinomycin D	Sigma
Ammoniumacetat	Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Riedel-de Haen
Arabinose	Sigma
Ase I	New England Biolabs
Bacitracin	Sigma
Bacto-Agar	Fluka
β-Mercaptoethanol	Roth
Borsäure	Merck
Bovines Serumalbumin (BSA) 30%	PAA Laboratories
Bromphenolblau	Merck
[¹⁴ C]-Protein-Größenstandard	Amersham
Ciprofloxacin Hydrochlorid	ICN Biochemicals
Complete Protease Inhibitors	Roche
Cycloheximid	Sigma

MATERIAL UND METHODEN

DIG-11-dUTP	Roche
DIG-Blocking-Reagenz	Roche
DIG-Easy Hyb	Roche
Digitonin, high purity	Calbiochem
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Dithiothreitol (DTT)	Merck
DNA-Größenstandard Hyperladder I	Bioline
DNase I	Roche
DNase I, RNase-frei	Roche
dNTPs	Roche
Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen
EDTA	Merck
EGTA	Merck
Essigsäure	Roth
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Biorad
FCS (Fötale Kälberserum)	Invitrogen
Ficoll 400	Serva
Formaldehyd 37%	Merck
Glycerol	Roth
Glycin	Neolab
HEPES	Serva
Hind <i>III</i>	New England Biolabs
Iodacetamid	Calbiochem
Isopropanol	Merck
Kaleidoscope Prestained Protein-Standard	Biorad
Kaliumchlorid	Roth
Kalziumchlorid	Roth
Kanamycin	Sigma
L-Glutamin (200mM; 100x)	Invitrogen
L-Methionin	Fluka
Magermilchpulver	Sucofin
Maleinsäure	Roth

MATERIAL UND METHODEN

Methanol	Merck
Methocel	Fluka
Minimal Essential Medium (MEM)	Sigma
MOPS	Roth
Natriumacetat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumcitrat	Roth
Natriumdesoxycholat	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydrogencarbonat	Roth
Natriumhydroxid	Merck
NCS (Serum neugeborener Kälber)	Invitrogen
NP40/Igepal	Sigma
OptiMEM	Invitrogen
Phosphonoessigsäure	Sigma
γ -[³² P]-ATP	MP Biomedicals
Penicillin (10.000U/ml)/Streptomycin (10.000 μ g/ml)	Invitrogen
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth
PMSF	Roth
poly dIC	Roche
Protein A-Sepharose	Amersham
Protein G-Sepharose	Amersham
Redivue PRO-MIX L-[³⁵ S]	Amersham
RNA-Größenstandard	Fermentas
RNA-Probenpuffer	Fermentas
Rotiphorese-30-Acrylamid	Roth
Rotiphorese-40-Acrylamid	Roth
RPMI 1640 ohne L-Cystein, L-Methionin	BioWhittaker
Saccharose	Roth
Salzsäure	Roth
Sap I	New England Biolabs
SeaKem LE Agarose	BioWhittaker

MATERIAL UND METHODEN

Sorbitol	Roth
Superscript II	Invitrogen
T4-DNA-Ligase	Fermentas
T4-Polynukleotid-Kinase	Roche
Taq-Polymerase	Invitek
TEMED	Roth
TNF α	R&D Systems
Tris-Base	Roth
Trypsin (TPCK-behandelt)	Sigma
Trypsin 2,5%	Invitrogen
Tween-20	Sigma
Vanadat	Alexis

4.1.3. Kits

Expand High Fidelity PCR System	Roche
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
Plasmid Midi Kit	Qiagen
Nucleobond AX100	Macherey-Nagel
QIAshredder	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen
LightCycler RNA Master SYBR Green I	Roche
DIG High Prime	Roche
ECL Plus Western Blotting Detection System	Amersham
Superfect Transfection Reagent	Qiagen
Lipofectamine2000/Lipofectamine2000 CD	Invitrogen
Luciferase Reporter Gene Assay, high sensitivity	Roche
ABI Prism Big Dye 3.1 Sequenzier-Kit	Applied Biosystems

4.1.4. Oligonukleotide

Tabelle 4.1 : Primersequenzen und PCR-Bedingungen

Gen	Primersequenzen	Zyklen (°C/sec)	Produkt
murines IFN β	5-CATGAACAACAGGTGGATCCTCCACGC-3 5 -TCAGTTTTGGAAGTTTCTGGTAAGTCTTCG- 3	35(94/30;60/30;72/30)	560 bp
murines IFN α 4	5 - CTGGTCAGCCTGTTCTCTAGGATG - 3 5 - TCAGAGGAGGTTCCCTGCATCA - 3	35(94/30;55/30;72/30)	314 bp
murines IRF7	5 - CAGCGAGTGCTGTTTGGAGAC - 3 5 - AAGTTCGTACACCTTATGCGG - 3	32(94/30;61/30;72/30)	352 bp
murine PKR	5 - GCCAGATGCACGGAGTAGCC - 3 5 - GAAAACTTGGCCAAATCCACC - 3	35(94/30;57/30;72/45)	722 bp
GAPDH	5 - ACCACAGTCCATGCCATCAC - 3 5 - TCCACCACCCTGTTGCTGTA - 3	30(94/30;60/30;72/30)	452 bp
humanes IFN β	5 - CTTTGCTCTGGCACAACAGGTAG - 3 5 - AGGATTTCCACTCTGACTATGGTC - 3	35(94/30;56/30;72/30)	564 bp
hIFN β (LC)	5 - AGCTGCAGCAGTTCAGAAAG - 3 5 - AGTCTCATTCCAGCCAGTGC - 3	siehe 4.5.8	110 bp
GAPDH (LC)	5 - TGCACCACCAACTGCTTA - 3 5 - GGATGCAGGGATGATGTTTC - 3	siehe 4.5.8	177 bp
MCMV M35	5 - CCGTCATCTGTTACACCATCAGC - 3 5 - TTATCTTCCAGGTTTCAGGGCG - 3	30(94/30;58/30;72/30)	160 bp
MCMV m42	5 - CTAATCGTCTCCGCCACCTCC - 3 5 - CGAATCTGCGGCAGCAGG - 3	30(94/30;57/30;72/30)	377 bp
MCMV M43	5 - CTATGTATCCCGAACGACTGGC - 3 5 - TGTCTCTCCTCTCTCCCCTTC - 3	30(94/30;58/30;72/30)	218 bp
MCMV M44	5 - TCAGGCCGCGCACTTTTG - 3 5 - TGGGCTTTGACCGCATGC - 3	30(94/30;57/30;72/30)	401 bp
MCMV M82	5 - TGTTGAGCGTCCTGGTTTCG - 3 5 - TGCACATCCCCCTACAAGT - 3	30(94/30;59/30;72/30)	225 bp
MCMV M83	5 - TCGTGGATGACGGTGGAAAC - 3 5 - GAGGTTGCGGTAGAATGGATTG - 3	30(94/30;59/30;72/45)	726 bp
MCMV M84	5 - CGAGTGCGAGCAGGAGAGGAC - 3 5 - GCGATGCGGACGAGCAAG - 3	30(94/30;59/30;72/30)	168 bp
MCMV IE1	5 - GAATAAAAGAGGGGGTGTGGTGTTA - 3 5 - CAGCAACTCATCTATCCAGACCT - 3	30(94/30;58/30;72/30)	433 bp
Sendai NP	5 - ATGGCCGGGTTGTTGAGC - 3 5 - GGCTCTTGTTGACCATAGGTCCA - 3	30(94/30;56/30;72/30)	427 bp

Die mit LC gekennzeichneten Primer wurden für die quantitative Real Time – PCR im LightCycler (Roche) verwendet.

MATERIAL UND METHODEN

4.1.5. Plasmide und BACs

Plasmide für die Generation rekombinanter Influenza A-Viren (freundlicherweise von Dr. Thorsten Wolff, RKI Berlin, zur Verfügung gestellt):

pPol I-PA, pPol I-PB1, pPol I-PB2, pPol I-NP, pPol I-NA, pPol I-HA, pPol I-M, pPol I-NS
pcDNA-PA, pcDNA-PB1, pcDNA-PB2, pcDNA-NP

pExpress-M2, pExpress-NA, pExpress-HA, pExpress-M1, pExpress-NS2/NEP

MCMV-BAC C3X (Wagner et al., 1999), pKD46 (Datsenko und Wanner, 2000), pACYC177 (NEB), pFRT2-Kana (Dr. Albert Zimmermann, HHU, Düsseldorf), pCP20 (Cherepanov und Wackernagel, 1995)

4.1.6. Antikörper

Tabelle 4.2 : Primäre Antikörper

Bezeichnung	Katalog-Nr.	Hersteller	Spezies	Vedünnung
IκBα (C-21)	sc-371	Santa Cruz	Kaninchen	1 : 2000
phospho-IκBα (Ser32)	9241	Cell Signaling	Kaninchen	1 : 1000
c-Jun	9162	Cell Signaling	Kaninchen	1 : 1000
phospho-c-Jun (Ser63)	sc-822	Santa Cruz	Maus	1 : 1000
ATF-2 (C-19)	sc-187	Santa Cruz	Kaninchen	1 : 1000
phospho-ATF-2 (Thr71)	9221	Cell Signaling	Kaninchen	1 : 1000
NF-κB p65 (F-6)	sc-8008	Santa Cruz	Kaninchen	1 : 2000
murines IRF3	51-3200	Zymed	Kaninchen	1 : 2000
humanes IRF3 (FL-425)	sc-9082	Santa Cruz	Kaninchen	1 : 2000
Caspase-3	611048	BD Biosciences	Maus	1 : 1000
Lamin A/C	2032	Cell Signaling	Kaninchen	1 : 1000
GAPDH	5G4 Clone6C5	Hy Test Ltd.	Maus	1 : 50.000
β-Actin	A2228	Sigma	Maus	1 : 20.000
Chroma101 (MCMV IE1)	---	Prof. Jonjic	Maus	1 : 1000
Ms X CMV (HCMV IE1)	MAB810R	Chemicon	Maus	1 : 15.000
HA	H6908	Sigma	Kaninchen	1 : 3000

Tabelle 4.3 : Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Katalog-Nr.	Hersteller	Spezies	Vedünnung
α -Maus POD	115-035-003	JIR (Dianova)	Ziege	1 : 3000
α -Kaninchen POD	A6154	Sigma	Ziege	1 : 3000

4.1.7. Bakterienstämme

E. coli, Stamm XL1-Blue F⁺::Tn10 *proA*-B-*lacI*- Δ (*lacZ*)M15/*recA1 endA1 gyrA96*
(Nal) *thi hsdR17* ($r_K m_K$) *glnV44 relA1 lac*

E. coli, Stamm DH10B F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) 80dlacZ Δ M15 Δ lacX74 *deoR*
recA1 endA1 araD139 Δ (*ara, leu*)7697 *galU galK* λ^- *rpsL nupG*

4.1.8. Zelllinien

NIH3T3 Maus-Fibroblasten, ATCC CRL-1658

IC-21 Maus-Makrophagen, ATCC TIB-186

MRC-5 Humane Fibroblasten, ATCC CCL-171

MDCKII Epithelzellen aus Hunde-Niere, Subklon von MDCK (ATCC CCL-34)

293T Humane Nierenzellen, ATCC CRL-11268

4.1.9. Viren

MCMV-C3X BAC-abgeleitete wt-Rekombinante MW97.01
mit wt-Eigenschaften *in vitro* und *in vivo*
(Wagner et al., 1999)

HCMV-AD169 Fibroblasten-adaptierter Laborstamm
(Chee et al., 1990)

Influenza A/ Δ NS1-Virus erhalten von Dr. Thorsten Wolff, RKI Berlin
(Garcia-Sastre et al., 1998)

Sendai-Virus (Stamm Z) erhalten von Dr. Thorsten Wolff, RKI Berlin

MATERIAL UND METHODEN

4.1.10. Mäuse

BALB/c

C57BL/6

IFN β -/- (BALB/c-Hintergrund) erhalten von Dr. Siegfried Weiss, Braunschweig

4.1.11. Puffer und Lösungen

LB(Luria-Bertani)-Medium

1% (w/v) Bacto-Trypton

5,5% (w/v) Bacto-Yeast-Extrakt

1% (w/v) NaCl

10x PBS; pH 7,4

136 mM NaCl

2,6 mM KCl

1,8 mM Na₂HPO₄ 2H₂O

1,5 mM KH₂PO₄

MCMV-Saccharose-VSB-Kissen; pH 7,8

15% Saccharose

50 mM Tris /HCl

12 mM KCl

5 mM EDTA

HCMV-Sorbitol-Kissen

20% (w/v) Sorbitol

50 mM Tris; pH 7,4

1 mM MgCl₂

100 μ g/ml Bacitracin

Methylcellulose (A)

8,8 g Methylcellulose in 360 ml H₂O

(mit Rührfisch) autoklavieren

bei 4°C ÜN rühren lassen

MATERIAL UND METHODEN

Methylcellulose (B)	vor Gebrauch zufügen: 40 ml 10x MEM 20 ml FCS 5 ml Penicillin/Streptomycin 5 ml L-Glutamin 20 ml NaHCO ₃ (55g/l)
4x Proteinase K-Puffer; pH 8,0	2% (w/v) SDS 40 mM Tris 20 mM EDTA
10x MEN; pH 7,0	200 mM MOPS 50 mM Natriumacetat 10 mM EDTA dunkel und bei 4°C lagern
10x TBE	900 mM Tris 900 mM Borsäure 20 mM EDTA; pH 8,0
6x TBE-Probenpuffer	10% (v/v) Glycerol 6x TBE Bromphenolblau
20x SSC	3 M NaCl 0,3 M NaCitrat
Maleinsäurepuffer	100 mM Maleinsäure; pH 7,5 150 mM NaCl
AP-Puffer	100 mM Tris/HCl; pH 9,5 100 mM NaCl

MATERIAL UND METHODEN

Cytoplasmatischer Lysepuffer; pH 7,4	10 mM KCl 20 mM HEPES 0,2% (v/v) NP40 1 mM EDTA 10% Glycerol 0,1 mM Vanadat 0,1 mM PMSF 1 mM DTT Complete Protease Inhibitors
Nukleoplasmatischer Lysepuffer; pH 7,6	420 mM KCl 20 mM HEPES 1 mM EDTA 20% (v/v) Glycerol 0,1 mM Vanadat 0,1 mM PMSF 1 mM DTT Complete Protease Inhibitors
EMSA Shift-Puffer	100 mM HEPES 20% (w/v) Ficoll 400 5 mM Mg Cl ₂ 200 mM KCl 0,5 mM EGTA 2,5 mM EDTA
5x SDS-Probenpuffer	0,25 M Tris/HCl; pH 6,8 25% (v/v) Glycerol 20% (w/v) SDS 0,5% (v/v) β-Mercaptoethanol Bromphenolblau

MATERIAL UND METHODEN

2x Nativer Probenpuffer	125 mM Tris/HCl; pH 6,8 30% Glycerol 12,5% (w/v) Saccharose Bromphenolblau
10x Lämmli-Elektrophoresepuffer	252 mM Tris 1,92 mM Glycin 1% (w/v) SDS
10x Semidry-Blot-Puffer	480 mM Tris 280 mM Glycin 20% (v/v) Methanol
10x TBST	0,1 M Tris/HCl; pH 8,0 1,5 M NaCl 5% (v/v) Tween-20
IP-Lysispuffer	140 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 20 mM Tris; pH 7,6 1% Digitonin (w/v) bzw. NP40 (v/v) 0,5-1 mM PMSF (frisch zugeben)
IP-Waschpuffer B	150 mM NaCl 10 mM Tris; pH 7,6 2 mM EDTA 0,2% Digitonin (w/v) bzw. NP40 (v/v)
IP-Waschpuffer C	0,5 mM NaCl 10 mM Tris; pH 7,6 2 mM EDTA 0,2% Digitonin (w/v) bzw. NP40 (v/v)

MATERIAL UND METHODEN

IP-Waschpuffer D	10 mM Tris; pH 8
1x IP-Probenpuffer	80 mM Tris/HCl; pH 6,8 5 mM EDTA 34% (w/v) Saccharose Bromphenolblau 3,2% (w/v) SDS (frisch zugeben) 40 mM DTT (frisch zugeben)
Fixierlösung	10% (v/v) Essigsäure 40% (v/v) Methanol

4.2. Konstruktion von Plasmiden und Arbeiten mit *E.coli*

4.2.1. Klonierung von NS1 und NS2

Die Generation der Inserts für die Klonierung der NS1- und NS2-cDNA von Influenza A für die Herstellung neun-segmentiger Viren erfolgte unter Verwendung der folgenden Primer:

NS1/2-1

5-GGCCGCTCTTCGGCCAGCAAAAGCAGGGTGACAAAGACTAGTATGGATCCAAACACT-3

NS1-2

5-GGCCGCTCTTCTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTTTTATTATTAATTAACCTTCTGACCTA
ATTGTT-3

NS2-2

5-GGCCGCTCTTCTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTTTTATTATTAATTAAGCTGAAATGA
GAAAGT-3

Nach der Amplifikation der cDNA (Annealing bei 55°C für 30 sec, 1min Elongation, 35 Zyklen) wurde das PCR-Produkt mit Sap I geschnitten und in den ebenfalls mit Sap I -verdauten Expressionsvektor pPol I kloniert.

4.2.2. Herstellung chemisch-kompetenter *E.coli* für Plasmid-Transformationen

100 ml LB-Medium wurden mit 1 ml ÜN-Kultur angeimpft und bei 37°C bis zur Dichte von OD₆₀₀ 0,5-0,7 geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien 10 min mit 3200 g (4000 rpm, 5810R, Eppendorf) bei 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 ml kaltem 0,1 M MgCl₂ resuspendiert. Die Bakterien wurden nochmals pelletiert und in 50 ml kaltem 0,1 M CaCl₂ resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 2 ml kaltem 0,05 M CaCl₂, 10% Glycerin aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden in 50µl-Aliquots in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

4.2.3. Herstellung elektro-kompetenter *E.coli* für die BAC-Mutagenese

Für die Arabinose-induzierte BAC-Rekombination wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml ÜN-Kultur (*E.coli*-Stamm DH10B mit MCMV-BAC und pKD46) angeimpft und bei 30°C bis zur Dichte von OD₆₀₀ 0,1-0,15 geschüttelt, bevor 1 ml 10% (w/v) Arabinose (frisch angesetzt in H₂O) zugegeben wurde, um die Rekombinase-Aktivität zu induzieren. Die Kultur wurde bei 30°C weiter geschüttelt, bis die OD₆₀₀ 0,25-0,3 erreicht wurde. Dabei sollte die Induktionszeit 35 min nicht überschreiten. Anschließend wurden die Bakterien 10 min mit 3200 g (4000 rpm, 5810R, Eppendorf) bei 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 ml kaltem H₂O/10%Glycerol resuspendiert. Die Bakterien wurden nochmals pelletiert und in 50 ml kaltem H₂O/10%Glycerol resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 0,5-1 ml kaltem H₂O/10%Glycerol (ca. 300µl pro 0,1 End-OD₆₀₀) aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden in 50µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

4.2.4. Transformation kompetenter *E.coli*

Um DNA in chemisch-kompetente *E.coli* zu transformieren, wurden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und mit der zu transformierenden DNA versetzt. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis wurde ein 45 sec – Hitzeschock bei 42°C durchgeführt. Anschließend

MATERIAL UND METHODEN

wurden die Bakterien 30-60 min bei 37°C geschüttelt, bevor sie auf LB-Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert wurden und ÜN bei 37°C inkubiert wurden.

Für die Transformation elektro-kompetener Zellen wurden die kompetenten *E.coli* nach dem Auftauen auf Eis und der Zugabe der zu transformierenden DNA unter Verwendung eines Elektroporators (Biorad) mit den Standardparametern für prokaryontische Zellen (2500V, 200Ω, 25μF) behandelt. Anschließend wurden die Bakterien 30-60 min bei 30°C (temperatur-sensitiver Origin, z.B. pKD46) oder 37°C geschüttelt, auf LB-Agar-Platten ausgestrichen und ÜN inkubiert.

4.2.5. Glycerin-Dauerkulturen

Um *E.coli*-Klone längerfristig aufzubewahren, wurden Glycerin-Dauerkulturen hergestellt. Hierfür wurden ÜN-Kulturen in LB-Flüssigmedium mit entsprechendem Antibiotikum angezogen und am folgenden Tag 1:1 mit Glycerin (autoklaviert) gemischt. Die Bakterien-Glycerin-Mischung wurde in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

4.3. Arbeiten mit eukaryontischen Zellen

4.3.1. Zellkultur

Für die Kultur von eukaryontischen Zellen wurde immer unter sterilen Bedingungen gearbeitet, um Kontaminationen zu vermeiden. Alle verwendeten Zellen wurden in DMEM (*Dulbeccos Modified Eagle Medium*) oder RPMI-1640 (Invitrogen, Schottland), welches mit 10% hitze-inaktiviertem (30 min, 56°C) FCS bzw. NCS (*Foetal Calf Serum* bzw. *Newborn Calf Serum*), 100 Einheiten/ml Penicillin, 100 μg/ml Streptomycin und 2 mM Glutamin versetzt wurde, in einem Inkubator mit 5% CO₂ bei 37°C kultiviert. Für die Passagierung der adhären Zellen wurden diese nach dem Entfernen des Zellkultur-Mediums mit PBS gewaschen und durch 0,3%ige Trypsin-Lösung (Invitrogen, in PBS verdünnt) vom Boden der Zellkulturgefäße gelöst, bevor sie für das Umsetzen in frischem Medium resuspendiert wurden.

4.3.2. Lagerung von Zellen in flüssigem Stickstoff

Für die mittel- bis längerfristige Erhaltung von Zellen wurden diese in flüssigem Stickstoff gelagert. Um zu verhindern, dass die Zellen durch die Entstehung von Kristallen zerstört werden, wurden sie in speziellem Einfriermedium eingefroren. Dieses Medium enthält 10% DMSO (v/v) und 50% bzw. 90% FCS (v/v). Hierbei hängt die verwendete FCS-Konzentration von der Sensitivität der einzufrierenden Zellen ab. Bei robusten Zelllinien reichen 50% FCS (und 40% DMEM), wogegen für sensitivere (z.B. primäre) Zellen 90% FCS (v/v) verwendet wurde. Für die Vorbereitung auf die Stickstoff-Lagerung wurden die Zellen abtrysiniert und in Medium resuspendiert, bevor sie in 5ml-Zentrifugenröhrchen bei 200 g (1000 rpm, 5810R, Eppendorf) für 1-2 min pelletiert wurden. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurden die Zellen in je 1 ml Einfriermedium pro Aliquot resuspendiert und in Cryo-Röhrchen (Nunc über Renner) überführt. Diese wurden in Cryo-Einfrierbehältern (Qualifreeze, Qualilab) langsam (-1°C/h) bei -80°C eingefroren, bevor sie in flüssigem Stickstoff gelagert wurden.

4.3.3. Präparation von primären murinen embryonalen Fibroblasten (MEF)

Für die Herstellung primärer MEFs wurde eine schwangere Maus (Tag 16/17) nach cervikaler Dislokation (Genickbruch) komplett in 70% Ethanol (v/v) desinfiziert, bevor ihr mit einer Fellschere die Bauchdecke aufgeschnitten wurde, um die Embryonen steril zu entnehmen. Die Embryonen wurden nach der Entfernung der inneren Organe in PBS gespült. Danach wurden die Embryonen in eine 10cm-Zellkulturschale mit wenig PBS (0,5 bis 1 ml) überführt und mit Hilfe einer gebogenen Schere zerkleinert. Je feiner die Gewebestückchen dieser Suspension waren, desto höher war die Ausbeute.

Die Gewebesuspension wurde mit einer 25ml-Pipette in ein 50ml-Zentrifugenröhrchen überführt, wobei gegebenenfalls mit PBS nachgespült wurde, um möglichst alle Gewebestückchen zu überführen. Die Gewebesuspension wurde im Zentrifugenröhrchen mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Um die Gewebestückchen von Erythrocyten zu befreien, ließ man die Stückchen ca. 5 min sedimentieren, bevor der Überstand, der die Erythrocyten enthält, entfernt wurde. Dieser Waschschrift wurde wiederholt, bis der PBS-Überstand sich nicht mehr rot färbte.

MATERIAL UND METHODEN

Um die Zellen aus dem Gewebe-Verbund zu lösen, wurden die Gewebestückchen in ca. 0,7% Trypsin in einem Erlenmeyerkolben mit Glasperlen und Rührfisch überführt. Hierbei sollte das verwendete Volumen nur so groß sein, dass die Glasperlen gerade so bedeckt waren. Die Suspension wurde 30 min bei 37°C gerührt, bevor 5ml 2,5%ige Trypsin-Lösung und 50µl DNase I (10mg/ml) zugegeben wurde. Anschließend wurde die Suspension weitere 30 min bei 37°C gerührt.

Die Zellsuspension wurde nun aus dem Erlenmeyerkolben mit einer 25ml-Pipette in 50ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Um möglichst wenige Zellen zu verlieren, wurden die Glasperlen mehrfach mit PBS gespült. Die Zellsuspensionen dieser Waschschrirte wurden mit der ersten Suspension vereinigt. Anschließend wurden die Zellen bei 200 g (1000 rpm, 5810R, Eppendorf) für 10 min bei RT pelletiert und der Überstand vorsichtig dekantiert. Die Zellen wurden in wenig Medium (DMEM, 10% FCS, Penicillin/Streptomycin, Glutamin) so gut wie möglich resuspendiert. Nachdem mit Medium auf 50 ml pro Zentrifugenröhrchen aufgefüllt wurde, ließ man die großen Zellaggregate absinken. Die Zellsuspension wurde ohne die großen Zellaggregate auf Zellkulturflaschen verteilt, wobei optimalerweise aus 10 Embryonen 4 bis 5 T175-Flaschen gewonnen wurden. Die verbliebenen Zellaggregate wurden erneut in wenig Medium resuspendiert und anschließend mit Medium auf 50 ml aufgefüllt, um möglichst viele Zellen aus den Aggregaten zu lösen. Nach dem Absinken verbleibender großer Zellaggregate wurde die Zellsuspension zu der ersten Suspension in die Zellkulturflaschen gegeben. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis das Medium nach dem Resuspendieren der Zellaggrgate nicht mehr trüb war.

Um das Trypsin möglichst gut zu inaktivieren, wurde die Zellsuspension in den Zellkulturflaschen mit Medium auf 80 bis 100 ml pro T157 aufgefüllt. 3 bis 5 h nach dem Anlegen der MEFs wurde das vorhandene Medium abgenommen und durch frisches Medium (25 ml pro T175) ersetzt. Dabei wurde vorher mikroskopisch sichergestellt, dass sich die Zellen bereits abgesetzt hatten und adherent waren. Die auf diese Weise gewonnenen Fibroblasten wurden als Passage 0 definiert. Die Passage 0-MEFs wurden 1:5 umgesetzt. Anschließend wurden die Passage 1-MEFs in den benötigten Aliquot-Größen (normalerweise T25, T75 und T175) für die Lagerung in flüssigem Stickstoff (siehe 4.3.2.) vorbereitet. Für Experimente wurden die MEFs optimalerweise in Passage 3 verwendet, wobei sie beim Passagieren 1:2 bis 1:3 umgesetzt wurden.

4.3.4. Transfektion

Die Transfektion eukaryontischer Zellen erfolgte unter Verwendung des „Superfect Transfection Reagent“ (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers oder mittels Lipofectamine2000 (Invitrogen) nach folgendem Protokoll: Für 5×10^5 Zellen wurden 3 μ l Lipofectamine2000 mit 125 μ l OptiMEM (Invitrogen) gemischt und 5 min bei RT inkubiert. 2 μ g der zu transfizierenden DNA wurden in 25 μ l OptiMEM aufgenommen und zu dem Lipofectamine2000-Mix pipettiert, durch Vortexen gemischt und 20 min bei RT inkubiert. Während dieser Inkubation wurden die Zellen gewaschen, trypsinisiert, pelletiert, in Transfektionsmedium (DMEM, Serum, ohne Antibiotika) aufgenommen und in die entsprechenden Zellkulturgefäße (80% Konfluenz) ausgesät. Zu der Zellsuspension wurde der Transfektionsmix tropfenweise zugegeben und durch Schwenken gemischt, bevor die Zellen 4-5 h bei 5% CO₂, 37°C inkubiert wurden. Abschließend wurde das Transfektionsmedium durch normales Kulturmedium ausgetauscht.

4.3.5. Inhibition der zellulären Transkription bzw. Translation

Um die *de novo* – Synthese von Proteinen zu hemmen, wurden die Inhibitoren Actinomycin D oder Cycloheximid eingesetzt. Die Inhibition der Transkription erfolgte durch Inkubation der Zellen in Medium, welches 5 μ g/ml Actinomycin D enthielt. Der Translationsinhibitor Cycloheximid wurde in der Konzentration 50 μ g/ml verwendet.

4.4. Virologische Arbeiten

4.4.1. Generation rekombinanter MCMV-Mutanten

Die Herstellung der MCMV-Mutanten erfolgte mittels homologer Rekombination linearer PCR-Produkte (siehe Abb. 2.12) in den wt MCMV-BAC MW97.01 (Wagner et al., 1999). Das lineare DNA-Fragment wurde unter Verwendung des Plasmids pACYC177 (NEB) bzw. pFRT2-Kana (Dr. Albert Zimmermann, HHU, Düsseldorf) als Template für die Kanamycin-Resistenzkassette generiert. Die Mutagenese-Primer enthielten Bindungsstellen für die Amplifikation der Resistenzkassette und zusätzlich jeweils eine 60 bp-Sequenz, die homolog

MATERIAL UND METHODEN

zu den flankierenden Enden der zu deletierenden Region des MCMV-Genoms ist. Dadurch wurde die Rekombination spezifischer Sequenzen ermöglicht und die zu deletierende Genomregion durch die Kanamycin-Resistenzkassette ersetzt. Die Entfernung der Resistenzkassette aus dem mutierten Genom wurde durch die zusätzliche Transformation des Plasmids pCP20 (Cherepanov und Wackernagel, 1995) erreicht. pCP20 kodiert für die FLP-Rekombinase, welche die Resistenzkassette mittels homologer Rekombination der beiden die Kassette flankierenden *frt*-Sequenzen entfernt. Dadurch wird eine zweite Mutagenese eines bereits mutierten Genoms vereinfacht, z.B. bei der Herstellung von Doppelmutanten oder der Reinsertion eines deletierten Gens.

4.4.2. Herstellung eines gereinigten MCMV-Stocks

25 T175-Zellkulturflaschen mit Passage 3-MEFs wurden mit MCMV infiziert. 6-9 Tage nach Infektion wurde das Medium mit den infizierten Zellen in 500ml-Zentrifugenbecher überführt. Die Zellreste wurden 10 min mit 5000 g (6000 rpm, J2-21, Beckman) bei 10°C pelletiert, der Überstand in 250ml-Zentrifugenbecher überführt und das Pellet verworfen. Nach einer Zentrifugation von 3 h mit 20.000 g (13.000 rpm, J2-21, Beckman) bei 10°C wurde das Virus-Pellet nach dem Verwerfen des Überstandes in 10 ml Medium resuspendiert und ÜN auf Eis (im Kühlraum) inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Virus-Suspension in einem „Douncer“ (Wheaton) homogenisiert und vorsichtig auf ein Saccharosekissen (15% Saccharose/ VSB) pipettiert. Anschließend wurde 1 h mit 100.000 g (27.000 rpm, OptimaL-70K, Beckman) bei 10°C zentrifugiert. Nach der Ultrazentrifugation wurde der Überstand abgegossen und das Virus-Pellet in 2-3 ml 15% Saccharose /VSB ÜN auf Eis (im Kühlraum) stehen gelassen. Die Viren wurden resuspendiert und mit Hilfe eines „Douncers“ homogenisiert, bevor Aliquots (20-50µl) bei -80°C eingefroren wurden.

4.4.3. Herstellung eines gereinigten HCMV-Stocks

20 T175-Zellkulturflaschen mit MRC-5 wurden mit HCMV infiziert, bis alle Zellen CPE zeigen und sich ablösen (ca. 9 Tage). Das Medium mit den infizierten Zellen wurde in 500ml-Zentrifugenbecher überführt, um die Zellreste 10 min mit 5000 g (6000 rpm, J2-21, Beckman) bei 15°C zu pelletieren. Anschließend wurde der Überstand in 250ml-Zentrifugenbecher überführt und 3 h mit 20.000 g (13.000 rpm, J2-21, Beckman) bei 15°C zentrifugiert, um die

MATERIAL UND METHODEN

Viren zu pelletieren. Das Virus-Pellet wurde nach dem Verwerfen des Überstandes in 10 ml Medium resuspendiert und in einem „Douncer“ (Wheaton) homogenisiert. Die Virus-Suspension wurde vorsichtig auf ein Sorbitolkissen pipettiert und 1 h mit 60.000 g (20.000 rpm, OptimaL-70K, Beckman) bei 10°C zentrifugiert. Nach der Ultrazentrifugation wurde der Überstand abgegossen. Das Virus-Pellet wurde in 2-3 ml PBS mind. 1 h bei 4-10°C stehen gelassen, bevor die Viren resuspendiert und mittels „Douncer“ homogenisiert wurden. Abschließend wurden Aliquots (30-50 µl) bei -80°C eingefroren.

4.4.4. Infektion mit MCMV und HCMV

Die CMV-Infektionsexperimente wurden mit permissiven Zellen durchgeführt. Die Infektion fand mit Verstärkung durch eine Zentrifugation statt, daher wurden die zu infizierenden Zellen in Platten (meist 6-Loch Platten) ausgesät. Nachdem die vorbereitete Virussuspension (Virus entsprechend verwendeter MOI in Zellkulturmedium verdünnt) auf die Zellen gegeben wurde, wurden die Platten 2 x 15 min bei 800 g (2000 rpm, 5810R, Eppendorf) zentrifugiert. Anschließend wurden die infizierten Zellen bei 5% CO₂, 37°C inkubiert.

4.4.5. Titration von MCMV und HCMV

Für die Bestimmung des Virus-Titers eines Stocks oder einer Virussuspension wurden im Fall von MCMV MEFs (Passage 3) und im Fall von HCMV MRC5-Zellen in 48-Loch Platten angelegt. Diese wurden mit einer sequenziellen 1:10 Verdünnungsreihe der zu titrierenden Virussuspension infiziert. 2 h nach der Zentrifugation (siehe 4.4.4.) wurde das Medium von den Zellen abgesaugt, um die Zellen mit semi-solidem Methylcellulose-Medium zu überschichten. Dadurch wurde sichergestellt, dass sich die Viren nur über Zell-zu-Zell-Ausbreitung vermehrten. 3 bis 4 Tage nach der Infektion wurden die entstandenen Plaques ausgewertet. Die CMV-Titer wurden in pfu (*plaque forming units*) pro ml angegeben.

4.4.6. UV-Inaktivierung von MCMV und HCMV

Um nicht-infektiöse CMV-Partikel zu erhalten, wurden die gereinigten Virus-Stocks entsprechend der verwendeten MOI in 1 ml Medium verdünnt und durch Behandlung mit

MATERIAL UND METHODEN

UV-Licht (UV-Strahler der Firma Benda, 254 nm, 10 cm Entfernung von der Lichtquelle) 20min inaktiviert. Anschließend wurde das Volumen mit Medium auf die benötigte Menge aufgefüllt. Die Infektion erfolgte wie in 4.4.4. beschrieben.

4.4.7. Herstellung von MCMV-Latenzserum

Balb/c- oder C57BL/6-Mäuse wurden mit wt-MCMV (2×10^6 pfu pro Maus, Titerbestimmung mit Verstärkung durch Zentrifugation) intraperitoneal infiziert. 6 Wochen nach Infektion wurde Blut entnommen (Herzpunktion) und Serum präpariert wurde. Dieses Serum, welches Antikörper gegen MCMV-spezifische Epitope enthielt, wurde z.B. in der Westernblot-Analyse von MCMV-Proteinen eingesetzt.

4.4.8. Infektion mit Influenza A

Für alle Infektionen mit Influenza A - Viren wurden titrierte, von Dr. Thorsten Wolff zur Verfügung gestellte Virus-Stocks verwendet. Die zu infizierenden Zellen wurden mit PBS gewaschen, bevor die vorbereitete Virussuspension (MOI 1, verdünnt in PBS/0,2%BSA) auf die Zellen pipettiert wurde. Das Volumen der Virussuspension wurde so gewählt, dass die Zellen mit möglichst wenig Flüssigkeit bedeckt waren, ohne auszutrocknen. Die Zellen wurden 45 min bei RT mit der Virussuspension inkubiert, wobei das Zellkulturgefäß alle 10-15 min leicht geschwenkt wurde, um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern. Nach der Inkubation wurden die Zellen 2-3 mal mit PBS gewaschen, bevor Infektionsmedium (DMEM, 0,2% BSA, 2 μ g/ml TPCK-Trypsin) zugegeben wurde. Die infizierten Zellen wurden anschließend bei 5% CO₂, 37°C inkubiert.

4.4.9. Herstellung rekombinanter Influenza A – Viren

Um rekombinante Influenza A-Viren zu generieren, wurde das System der Reversen Genetik nach (Neumann et al., 1999) verwendet (siehe Abb. 2.10). Hierfür wurden Expressionsplasmide, welche die Segmente des RNA-Virusgenoms (Influenza A-Stamm PR8) als cDNA hinter einem RNA-Polymerase I – abhängigen Promotor enthalten, zusammen mit PA-, PB1-, PB2- und NP-exprimierenden Vektoren (Untereinheiten der viralen RNA-abhängigen

MATERIAL UND METHODEN

Polymerase und virales Nukleo-Protein, unter Kontrolle des CMV-Promotors) mittels Lipofectamine2000 in 293T-Zellen transfiziert (siehe 4.3.4). Um die Effizienz der Virusproduktion zu erhöhen, wurden zusätzlich zu NP und der viralen Polymerase alle viralen Strukturproteine in den Zellen exprimiert. Da die 293T-Zellen zwar sehr gut transfizierbar, aber nicht besonders permissiv für Influenza A-Viren sind, wurden die transfizierten 293T-Zellen mit permissiven MDCKII-Zellen kokultiviert, um die Replikation der neu entstandenen rekombinanten Viren zu unterstützen. Aus den Überständen der Kokultivierung wurde zu verschiedenen Zeitpunkten (1-4 Tage nach Transfektion) der HA-Titer gemessen, um zu untersuchen, ob Influenza A-Viren generiert wurden.

4.4.10. Bestimmung des Hämagglutinations (HA) - Titers von Influenza A

Für die Abschätzung der Influenza-Konzentration in Überständen infizierter oder für die Generation rekombinanter Influenza-Viren transfizierter Zellen wurde ein HA-Test durchgeführt. Das Hämagglutinin an der Oberfläche der Viruspartikel vernetzt Erythrocyten durch die Bindung an endständige Neuraminsäuren. Dadurch bleiben die Erythrozyten in Lösung und sinken nicht ab, so dass man visuell quervernetzte und nicht vernetzte Erythrocyten unterscheiden kann. Da auch *defective interfering particles* zur Hämagglutination beitragen können, ist mit dieser Methode keine Unterscheidung zwischen infektiösen und nicht-infektiösen Viruspartikeln möglich.

Die Bestimmung des HA-Titers wurde in eine 96-Loch Mikrotiterplatte mit V-förmigem Boden (Greiner) durchgeführt. 100µl Virussuspension wurde in das erste Loch und je 50µl PBS in die folgenden Löcher pipettiert. Die Virussuspension wurde in einer 1:2 Verdünnungsreihe in dem vorgelegten PBS verdünnt, bevor in jedes Loch 50µl einer 1%igen Hühnererythrocyten-Lösung (verdünnt in PBS) pipettiert wurde. Anschließend wurde die Platte ca. 30 min auf Eis inkubiert, um Neuramidase-Aktivität zu verhindern. Nach der Inkubation wurde bestimmt, in welcher Verdünnung genug Viruspartikel vorhanden waren, um die Erythrocyten zu vernetzen. Als HA-Titer bezeichnet man den reziproken Wert der Verdünnungsstufe, bei der gerade noch eine Hämagglutination beobachtet wird.

4.4.11. Infektion mit Sendai Z

Für die Infektion mit Sendai-Virus zur Induktion der IFN β -Expression wurden die Zellen (z.B. NIH3T3) mit PBS gewaschen, bevor die vorbereitete Virussuspension (200 HA-Einheiten pro ml, verdünnt in Medium) auf die Zellen pipettiert wurde. Das Volumen der Virussuspension wurde so gewählt, dass die Zellen mit möglichst wenig Flüssigkeit bedeckt waren, ohne auszutrocknen. Die Zellen wurden 45 min bei RT mit der Virussuspension inkubiert, wobei das Zellkulturgefäß alle 10-15 min leicht geschwenkt wurde, um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Nach der Zugabe von mit 0,2% BSA supplementierten Medium wurden die Zellen bei 5% CO₂, 37°C inkubiert.

4.5. Molekularbiologische Methoden

4.5.1. Arbeiten mit Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte je nach Mengen-Bedarf mit dem „QIAPrep Spin Mini Kit“ oder dem „QIAfilter Plasmid Midi Kit“ (beide Qiagen) nach den Angaben des Herstellers. Alle Arbeiten mit Plasmid-DNA wurden nach Standard-Protokollen durchgeführt.

4.5.2. Arbeiten mit BAC-DNA

Bei Arbeiten mit BAC-DNA ist zu beachten, dass diese aufgrund ihrer Größe durch mechanische Belastung geschert werden kann. Daher sollte sie nicht durch Vortexen gemischt und nur mit abgeschnittenen Spitzen pipettiert werden.

Für die Minipräparation von BAC-DNA wurden 10 ml ÜN-Kultur (mind. 16 h geschüttelt) bei 3200 g (4000 rpm, 5810R, Eppendorf) abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 200 μ l P1 (50 mM Tris/HCl, pH 8; 10mM EDTA; 100 g/ml RNase A) resuspendiert und in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt. Für die Lyse der Zellen wurden 300 μ l P2 (0,2 M NaOH; 1% SDS) zugegeben und durch Invertieren der Gefäße gemischt. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT wurden 300 μ l P3 (3 M K-Acetat, pH 4,6) zugegeben, zügig gemischt und erneut für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde für 10 min bei 16.000 g (13.000 rpm, 5415D, Eppendorf) die genomische DNA mit den denaturierten

MATERIAL UND METHODEN

Proteinen pelletiert, wobei die BAC-DNA im Überstand verbleibt. Der Überstand wurde durch vorsichtiges Dekantieren in ein neues 2ml-Reaktionsgefäß überführt und mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert. Die Extraktion wurde solange wiederholt, bis die Interphase nicht mehr sichtbar war. Abschließend wurde die BAC-DNA mit 1 Volumen Isopropanol gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und in 50-100 µl EB-Puffer mit 10 µg/ml RNase A aufgenommen.

Die BAC-Minipräparationen wurden zum Testen von *E.coli*-Kolonien auf eine erfolgreiche homologe Rekombination verwendet. Für die Isolierung größerer Mengen BAC-DNA, z.B. für die Rekonstitution von CMV-Mutanten, wurde das „Nucleobond AX100“ Kit (Macherey-Nagel) verwendet, wobei die Präparation nach den Angaben des Herstellers durchgeführt wurde.

4.5.3. Arbeiten mit RNA

Für Arbeiten mit RNA wurden nur RNase-freie Lösungen verwendet, um eine Degradation der RNA zu verhindern. Die Präparation der Gesamt-RNA erfolgte mit dem „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen) aus ca. 1×10^7 Zellen pro Probe. Zum Aufbrechen der Zellen wurden die „QIAshredder“ (Qiagen) benutzt.

4.5.4. Southernblot und Hybridisierung

Die Analyse mutierter MCMV-BACs erfolgte mittels Southernblot-Hybridisierung mit einer Sonde gegen die inserierte Resistenzkassette oder gegen das deletierte Gen. Die BAC-DNA wurde mit einem passenden Enzym verdaut (normalerweise *HindIII* oder *AseI*) und in einem 0,5%igem Agarosegel aufgetrennt. Hierbei wurde eine Gelapparatur mit möglichst langer Laufstrecke gewählt, um eine gute Trennung der relativ großen Fragmente zu erzielen. Nach dem Gellauf wurden die DNA-Fragmente behandelt (15min 250mM HCl; 2x15min 0,5N NaOH, 1,5M NaCl; 2x15min 0,5M Tris/HCl pH7,5 3M NaCl; zwischen den verschiedenen Lösungen mit H₂O spülen), um auch den Transfer sehr großer Fragmente zu erreichen. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe der Turbo-Blot-Apparatur (Schleicher & Schuell) nach den Angaben des Herstellers mittels Kapillarblot mit 20x SSC auf eine Nylonmembran (Hybond NX, Amersham) transferiert. Nach dem Transfer wurde die DNA durch UV-Bestrahlung kovalent an die Membran gebunden (UV-Crosslinker CL-1000, UVP), bevor die

MATERIAL UND METHODEN

Prähybridisierung in „DIG-Easy Hyb“ Puffer (Roche) bei 42°C für mind. 1 h durchgeführt wurde. Die Hybridisierung erfolgte mit der denaturierten Sonde (in „DIG-Easy Hyb“) bei 42°C ÜN. Vor der Detektion wurde die Membran 2 mal kurz mit 2x SSC, 0,1% SDS gespült und anschließend 2x15 min bei 68°C mit 0,1x SSC, 0,1% SDS gewaschen.

4.5.5. Northernblot und Hybridisierung

Die zu untersuchenden RNA-Proben wurden in einem MEN-Formaldehyd-Gel aufgetrennt und nach kurzem Waschen des Gels in H₂O mittels Turbo-Blot-Apparatur (siehe 4.5.4) auf eine Nylonmembran transferiert. Die Membran wurde nach dem Transfer wie in 4.5.4 beschrieben behandelt. Der einzige Unterschied liegt in der Hybridisierungstemperatur: Die Prähybridisierung und die Hybridisierung ÜN erfolgte bei 55°C.

4.5.6. Herstellung Digoxigenin (DIG)-markierter Sonden

Die DIG-markierten DNA-Sonden wurden entweder mit Hilfe des „DIG High Prime“ Kits (Roche) nach den Angaben des Herstellers oder mittels PCR unter Verwendung genspezifischer Primer hergestellt. Für die Markierung mittels PCR wurde DIG-dUTP verwendet, wobei der dNTP-Mix 3,5 mM DIG-dUTP, 6,5 mM dTTP und je 10 mM dATP, dCTP und dGTP enthielt. Die Primerbindung während der PCR fand bei der für die verwendeten Primerpaare spezifischen Temperatur statt (siehe Tabelle 4.1). Die Dauer der Elongationsphase wurde nach der erwarteten Größe des PCR-Produkts gewählt. Zur Kontrolle wurde das DIG-markierte PCR-Produkt neben dem nicht markierten Produkt in einem Agarosegel aufgetrennt. Bei einer erfolgreichen Markierung verlangsamt sich die Laufeigenschaft des PCR-Produktes im Vergleich zu dem nicht markierten Produkt.

4.5.7. DIG-Detektion

Die Detektion der Sondenhybridisierung erfolgte mit dem Digoxigenin-System der Firma Roche. Hierfür wurde die Membran zunächst in 1,5% Blocking-Reagenz (Roche, in Maleinsäurepuffer verdünnt) für 30 min bei RT inkubiert, um unspezifische Signale zu minimieren. Anschließend wurden DIG-spezifische Antikörper (anti-DIG AP, Roche)

MATERIAL UND METHODEN

zugegeben und weitere 30 min inkubiert. Um die nicht gebundenen Antikörper zu entfernen, wurde die Membran 3 mal für 10 min mit Maleinsäurepuffer gewaschen. Nach dem Waschen wurde die Membran 5 min mit AP-Puffer behandelt, danach 5 min in der Substratlösung (CDP-Star, Roche) geschwenkt und abschließend zwischen Whatman-Papier getrocknet und in Klarsichtfolie eingeschlagen. Die an die Antikörper gekoppelte Alkalische Phosphatase dephosphoryliert das zugegebene Substrat, wobei Energie in Form von Licht freigesetzt wird, so dass unter Verwendung eines „BioMax MR“ Films (Kodak) die Signale sichtbar gemacht werden können.

4.5.8. Semi-quantitative RT-PCR

Für die semi-quantitative Analyse von mRNA-Transkripten aus Gesamt-RNA wurde das „OneStep RT-PCR“ Kit (Qiagen) verwendet. Statt der vom Hersteller empfohlenen 50µl-Ansätze wurden die RT-PCRs in 10µl-Ansätzen pipettiert. 5 µl des RT-PCR Ansatzes wurden anschließend im Agarosegel analysiert. Als Template wurden verschiedene Verdünnungen von DNase I – behandelter Gesamt-RNA (RNase-freie DNase I, Roche) eingesetzt, wobei die Proben mengenmäßig untereinander abgeglichen wurden. Es wurden diejenigen Verdünnungen für die semi-quantitativen Analysen eingesetzt, die für das zu untersuchende Transkript limitierend sind. Die Annealing-Temperatur, die Dauer der Elongation sowie die Anzahl der Zyklen richteten sich nach den verwendeten genspezifischen Primern (siehe Tabelle 4.1).

<u>RT-PCR Ansatz</u>		<u>RT-PCR Programm</u>	
5x Puffer	2 µl	50°C	30 min
dNTP-Mix	0,6 µl	<u>95°C</u>	<u>15 min</u>
Primer 1	0,4 µl	94°C	30 sec
Primer 2	0,4 µl	x °C	30 sec
Enzym-Mix	0,6 µl	<u>72°C</u>	<u>x sec</u>
RNA	1 µl	72°C	10 min
H ₂ O	5 µl	4°C	∞

4.5.9. Quantitative Realtime-PCR

Die Durchführung der quantitativen Realtime-PCR Analysen erfolgte unter Verwendung des „LightCycler RNA Master SYBR Green I“ Kits (Roche) nach den Angaben des Herstellers. Die Annealing-Temperatur der verwendeten Primer lag bei 61°C. Die PCR wurde mit 45 Zyklen durchgeführt.

4.5.10. Luciferase-Reportergenassay

Die Luciferase-Reportergen-Experimente wurden mit Hilfe des „Luciferase Reporter Gene Assay, high sensitivity“ Kits (Roche) durchgeführt. Für die Bestimmung der NF-κB-Aktivität wurden Zellen mit dem Reporterplasmid 6x κB (zur Verfügung gestellt von Prof. Klaus Schulze-Osthoff, HHU, Düsseldorf) mittels Lipofectamine2000 CD transfiziert (siehe 4.3.4.) und 24 h später in die gewünschten Zellkulturgefäße ausgesät. Am folgenden Tag wurden diese Zellen dem Ziel des Experiments entsprechen infiziert oder behandelt. Für die Bestimmung der Luciferase-Aktivität wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit 100µl Lysepuffer pro $2,5 \times 10^5$ Zellen überschichtet und in dem Zellkulturgefäß eingefroren (-20°C). Auf diese Weise konnten Proben von verschiedenen Punkten parallel gemessen werden. Nach dem Auftauen wurden die Lysate in ein Reaktionsgefäß überführt und 2 min bei 16.000 g (13.000 rpm, 5415D, Eppendorf) zentrifugiert. 80 µl des geklärten Überstandes wurden für die Bestimmung der Luciferase-Aktivität mit Hilfe des MicroLumat LB96P (Berthold) nach den Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Lumineszenz wurde 1,6 sec nach Injektion des Substrats für 10 sec gemessen.

4.6. Proteinanalytische Methoden

4.6.1. Herstellung von Gesamtzell-Proteinlysaten

Bei der Herstellung nicht-fraktionierter Proteinlysate für den Nachweis nicht-phosphorylierter Proteine wurde der Lysepuffer aus dem „Luciferase Reporter Gene Assay, high sensitivity“ Kit (Roche) verwendet. Hierfür wurden die Zellen abgekratzt, pelletiert und mit kaltem PBS gewaschen, bevor sie in Lysepuffer (pro 10^6 Zellen ca. 50 µl) resuspendiert und bei -20°C

MATERIAL UND METHODEN

eingefroren wurden. Vor der weiteren Verwendung der Lysate wurden sie nach dem Auftauen 2 min bei 16.000 g (13.000 rpm, 5415D, Eppendorf) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für Westernblot-Analysen verwendet.

4.6.2. Herstellung nativer nukleoplasmatischer und cytoplasmatischer Proteinlysate

Um native Proteinlysate unter Erhaltung der Phosphorylierungen (z.B. für EMSA-Analysen, Nachweis von Phospho-Proteinen oder Dimeren) zu erhalten, wurden Lysate nach folgendem Protokoll hergestellt:

Je nach Zelltyp wurden 10^6 - 10^7 Zellen pro Probe abgekratzt, pelletiert und 2 mal mit kaltem PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 150µl cytoplasmatischem Lysepuffer durch 8-maliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine 16sec-Zentrifugation (13.000 rpm einstellen, 5415D, Eppendorf), um die nukleären Proteine aus dem cytoplasmatischen Lysat zu entfernen. Der Überstand-1 aus diesem Schritt wurde 10 min mit 18.000 g (14.000 rpm, 3K30, Sigma) bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand-2, der nun erhalten wurde, stellte das cytoplasmatische Lysat dar. Dieses Lysat wurde in vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert und umgehend in Flüssigstickstoff schockgefroren. Das Pellet-1 aus der 16sec-Zentrifugation wurde 2 mal mit kaltem PBS gewaschen, anschließend in 150µl nukleoplasmatischem Lysepuffer resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Abschließend wurde das Lysat 20 min mit 18.000 g (14.000 rpm, 3K30, Sigma) bei 4°C zentrifugiert, der Überstand in vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert und umgehend in Flüssigstickstoff schockgefroren. Die auf diese Weise gewonnenen nativen cyto- und nukleoplasmatischen Proteinlysate wurden bei -80°C gelagert. Für die Untersuchung von Gesamtzellproteinen aus den nativen Lysaten wurden cyto- und nukleoplasmatische Lysate 1:1 gemischt.

4.6.3. Diskontinuierliche SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Für die denaturierende SDS-PAGE wurde das Minigel Twin – System der Firma Biometra verwendet. Den verschiedenen Größen der zu untersuchenden Proteine entsprechend wurden die Gele mit unterschiedlicher Prozentigkeit an Acrylamid gegossen (siehe Tabelle 4.4). Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 20 mA pro Gel für 1-1,5 h. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese 5 min bei 95°C in denaturierendem Probenpuffer aufgekocht.

Tabelle 4.4 : Zusammensetzung der SDS-Gele

	Trenngel			Sammelgel
	8%	10%	12%	5%
30% Acrylamid	3,2 ml	4 ml	4,8 ml	1,5 ml
2 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 ml			
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)				1,2 ml
60% Saccharose				2,1 ml
20% SDS	60 µl			45 µl
H ₂ O	6,1 ml	5,3 ml	4,5 ml	4,2 ml
TEMED	24 µl			12 µl
10% APS	144 µl			120 µl

4.6.4. Native PAGE

Die native PAGE erlaubt die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen in ihrem nativen Zustand, so dass z. B. Dimere und Komplexe dargestellt werden können. Die nativen Gele wurden wie in 4.6.3. beschrieben gegossen, mit dem Unterschied, dass kein SDS zugegeben wurde. Für die Elektrophorese wurde die äußere Anodenkammer mit Lämmli-Laufpuffer ohne SDS befüllt. Der Puffer für die innere Kathodenkammer enthielt zusätzlich 0,2% Natrium-Deoxycholat. Der Vorlauf (45 mA pro Gel, 30 min) und die Elektrophorese der Proteine (20 mA pro Gel, 1h 15min) wurde bei 4°C durchgeführt. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese 1:1 mit 2x nativem Probenpuffer versetzt und ohne Aufkochen in die Taschen pipettiert. Für die Detektion von IRF3-Dimeren wurden 8%ige Gele verwendet.

4.6.5. Westernblot

Die Detektion der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine erfolgte mittels Westernblot-Analyse mit spezifischen Antikörpern (siehe Tabelle 4.2). Die Proteine wurden durch das Semidry-Blotverfahren (Biometra-Apparatur) auf eine Nitrocellulose-Membran (Amersham) transferiert. Der Aufbau des Blots sah folgendermaßen aus: Anode, 3x 3mm-Whatman-Papier, Nitrocellulose-Membran, Gel, 3x 3mm-Whatman-Papier, Kathode. Nach dem

MATERIAL UND METHODEN

Transfer wurden die Proteine zur Kontrolle mit Ponceau-Rot reversibel angefärbt (außer bei Detektion von Phospho-Proteinen). Zum Blockieren der Membran wurde mind. 30 min in 5% Milchpulver/TBST inkubiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte für 1 h bei RT oder ÜN bei 4°C (Phospho-Blots), die Inkubation des sekundären POD-gekoppelten Antikörpers erfolgte für 30 min bei RT. Die verwendeten Antikörper-Verdünnungen sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst. Nach mind. 3 Waschschritten mit TBST für je 10 min bzw. dreimaligem Spülen mit H₂O, 5 min TBST, 5 mal Spülen mit H₂O (Phospho-Blots) wurde die Membran unter Verwendung des „ECL Plus Western Blotting Detection Systems“ (Amersham) und der „BioMax MR“ Filme (Kodak) detektiert.

4.6.6. EMSA (*electro mobility shift assay*)

Analysen bezüglich Protein-DNA-Interaktionen (z.B. Bindung von Transkriptionsfaktoren an spezifische DNA-Sequenzen) wurden mittels EMSA durchgeführt. Die Herstellung der γ -[³²P]-markierten Sonden erfolgte durch eine T4-Phosphotransferase-Reaktion, bei der eine markierte Phosphatgruppe auf das eingesetzte dsDNA-Oligonukleotid (Santa Cruz; Sequenz mit NF- κ B *consensus site*: 5-AGTTGAGGGGACTTCCCAGGC-3) übertragen wurde. Das Reaktionsgemisch enthält nach der Markierung noch freie radioaktive Nukleotide. Um diese zu entfernen, wurde eine Microspin-Sephadex-G-25-Säule (Amersham) verwendet. Die fertige Sonde wurde in einer Bindungsreaktion mit nativen Proteinlysaten (siehe 4.6.2) inkubiert, so dass sich Protein-DNA-Interaktionen ausbilden konnten. Im Folgenden sind die Bestandteile dieser Reaktion aufgelistet.

EMSA-Bindungsreaktion

1,3	μl	DTT
2,5	μl	H ₂ O
2	μl	poly dIC (1 mg/ml; Roche)
2,5	μl	Shift-Puffer
0,2	μl	radioaktive Sonde
4,5	μl	natives Proteinlysat

Die Reaktion wurde für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die Zugabe von Antikörpern (*Supershift*) oder nicht-markierten Kompetitor-DNA-Fragmenten konnte die Spezifität von Komplexen nachgewiesen werden. Die Protein-DNA-Komplexe wurden auf in einem Polyacrylamid-Gel in 0,25x TBE als Laufpuffer aufgetrennt, wobei eine

MATERIAL UND METHODEN

Präequilibrierung bei 400 V durchgeführt wurde, bis die Stromstärke unter 10 mA gesunken war. Nach dem Auftragen der Proben wurde das Gel bei 50 mA im 4°C-Raum gefahren.

EMSA-Gel

41	ml	H ₂ O
2,4	ml	5x TBE-Puffer
6	ml	Rotiphorese-40-Acrylamid
1	ml	APS (10 % w/v)
100	µl	TEMED

Für den Nachweis der Protein-DNA-Komplexe wurde das EMSA-Gel auf ein Whatman-Papier transferiert und getrocknet (Gel dryer 583, Biorad), bevor mittels Auflegen eines Films (BioMax MR, Kodak) die Banden durch Autoradiographie sichtbar gemacht wurden.

4.6.7. Metabolische Markierung mit [³⁵S]-Methionin und [³⁵S]-Cystein

Um überexprimierte Proteine nachzuweisen oder für die Durchführung einer radioaktiven Immunopräzipitation wurden pro Probe ca. 10⁶ Zellen metabolisch markiert. Die Markierung erfolgte durch die Verwendung von [³⁵S]-Methionin und [³⁵S]-Cystein (Redivue PRO-MIX L, Amersham), welches bei der Proteinsynthese eingebaut wurde. Hierfür wurden die Zellen mit PBS/3%FCS mehrfach gewaschen, bevor sie 1h in Hungermedium (Methionin- und Cystein-frei, Gibco) bei 37%, 5% CO₂ inkubiert wurden. Nach dem Hungern wurden pro Ansatz 10 µl Redivue PRO-MIX L zugegeben und die Zellen je nach Experiment 5-60 min markiert (37%, 5% CO₂). Anschließend wurden die Zellen 3 mal mit kaltem PBS gewaschen und für die entsprechenden Anwendungen weiterverarbeitet.

4.6.8. Immunopräzipitation (IP)

Bei der Herstellung von IP-Lysaten wurden die Zellen abgekratzt, pelletiert und zweimal mit PBS gewaschen, bevor sie in 1ml IP-Lysispuffer resuspendiert wurden. Die Lyse fand für 20-30 min auf Eis statt. Um Zellreste aus dem Lysat zu entfernen, wurde anschließend 30 min mit 16.000 g (13.000 rpm, 5417R, Eppendorf) bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach diesem Schritt ist ein Einfrieren der Proben möglich (Flüssigstickstoff, -80°C). Die Immunopräzipitation wurde durch die Zugabe von

MATERIAL UND METHODEN

Serum oder spezifischen Antikörpern eingeleitet. Die Bildung der Immunokomplexe fand für 1 h (direkte IP) oder ÜN (Ko-IP) bei 4°C in einem Über-Kopf-Taumler statt. Anschließend wurden 40µl Protein-A-Sepharose bzw. Protein-G-Sepharose dazugegeben (abgeschnittene Spitzen). PAS/PGS wurde vorher 2 mal mit IP-Waschpuffer B gewaschen und 1:1 in IP-Waschpuffer B gemischt. Die Inkubation der Sepharose mit den Immunokomplexen erfolgte für 1h bei 4°C im Über-Kopf-Taumler. Danach wurde die Sepharose 30 sec bei 16.000 g (13.000 rpm, 5417R, Eppendorf) zentrifugiert. Das Sepharose-Pellet wurde 3 mal mit je 1 ml IP-Waschpuffer B, bei Bedarf 2 mal mit je 1 ml IP-Waschpuffer C (Hochsalzbedingungen) und abschließend 2 mal mit je 1ml IP-Waschpuffer D gewaschen. Am Ende wurde das Sepharose-Pellet von sämtlichem Überstand befreit und in dem passenden Probenpuffer aufgekoht.

Bei nicht-radioaktiven IPs erfolgte die weiterführende Analyse mittels Westernblot, bei radiaktiven IPs mittels Autoradiographie.