

2. Materialien und Methoden

2.1. Abkürzungen

BSA	Bovine serum albumine (Rinderserum-Albumin)
cpe	Zytopathischer Effekt
DMEM	Dulbecco´s modifiziertes Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FKS	Fötales Kälberserum
g	relative Erdbeschleunigung
HRV-14	Humanes Rhinovirus Typ 14
ICAM-1:IgG	Hybrid-Immunglobulin vom IgG-Typ mit 2 extrazellulären ICAM-1-Anteilen anstelle der Fab-Teile
IE	Internationale Einheiten
IgG	Immunglobulin G
kD	Kilodalton
MEM	Minimal Essential Medium
M	molar
ml	Milliliter

m.o.i.	multiplicity of infection (Multiplizität der Infektion)
MW	Molecular Weight (Molekulargewicht)
NBF	neutral gepuffertes Formaldehyd
OPD	ortho-Phenylendiamin x 2 HCl
p.i.	post infectionem (nach der Infektion)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
p.f.u.	Plaque forming unit (infektiöse Einheit)
pNPP	para-Nitrophenylphosphat
PPO	2,5-Diphenyloxazol
SDS	Sodiumdodecylsulfate (Natrium-Lauryl-Sulfat)
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
rpm	Umdrehungen pro Minute
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht
µl	Mikroliter

2.2. Verwendete Medien

Eagle's Minimal Essential Medium (MEM)	<p>Eagle's Zellkulturmedium mit Earle's Salzen und L-Glutamin (Gibco BRL):</p> <p>Zugabe von folgenden Zusätzen zu 500 ml MEM (jeweils von Gibco BRL):</p> <p>5 ml MEM Non Essential Amino Acids</p> <p>5 ml Antibiotic-Antimycotic</p> <p>0,5 ml Gentamycin (= 1 ml/l)</p> <p>30 ml 1 M HEPES-Puffer (=20 mM)</p> <p>5,85 ml 7,5% Na₂CO₃ (=0,085%)</p>
Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium (DMEM)	<p>Eagle's Zellkulturmedium mit L-Glutamin und 4,5 g Glukose/l (Gibco BRL):</p> <p>Zugabe von folgenden Zusätzen zu 500 ml MEM (jeweils von Gibco BRL):</p> <p>5 ml Na-Pyruvat (100 mM)</p> <p>5 ml Antibiotic-Antimycotic</p> <p>0,5 ml Gentamycin (= 1 ml/l)</p>
Eagle's Overlay Medium	<p>Eagle's Zellkulturmedium für Plaque Test (=1,3x konzentriert) (Gibco BRL):</p> <p>Eagle's MEM-Pulver für 5 Liter</p> <p>ad 3750 ml Aqua bidest.</p>

pH-Wert einstellen 7,0-7,4

Spinner-Medium Zellkulturmedium für Suspensionszellen mit Zusätzen
(jeweils von Gibco BRL):

Spinner-Medium Pulver für 5 Liter (570,02 g)

0,5 g Streptomycin

0,5 ml Penicillin 1 Mio. IE

10 g Na₂CO₃

ad 5000 ml Aqua bidest.

pH-Wert einstellen 7,0-7,4

2.3. Verwendete Lösungen, Puffer und Seren

Actinomycin-Stammlösung	10 mg Actinomycin D (Boehringer) lösen in 7,3 ml Ethanol ad 10 ml mit Aqua bidest.
Agar-Lösung	0,8% (Gew./Vol.) Lösung: 0,8 g Agar (Difco Laboratories) ad 100 ml Aqua bidest.
Antibiotic-Antimycotic	von Gibco BRL: 10000 IE Penicillin 10000 µg Streptomycin 25 µg Fungizone ad 1 ml PBS
Cacodylat-Puffer	3,21 g Na-Cacodylat (Serva) 204,5 mg NaCl ad 100 ml Aqua bidest., pH 7.2
DOC	Natrium-Desoxycholat (Sigma Chemie)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Merck): 0,93 g ad 1000 ml PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺
ERL 4206	Vinylcyclohexendioxid (Serva)

Färbelösung für ELISA	40 mg ortho-Phenylendiamin x HCl (Merck) ad 100 ml Färbepuffer
Färbepuffer für ELISA	3,65 g Zitronensäure x H ₂ O 5,93 g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O ad 500 ml Aqua bidest.
FKS	fötales Kälberserum (Gibco BRL)
Gentamycin	von Gibco BRL: 50 µg Gentamycinsulfat ad 1 ml Aqua bidest.
HEPES-Puffer	1 M HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansäure) (Gibco BRL)
Imidazol-Puffer	68,1 mg Imidazol (Serva) 876 mg NaCl 8,3 mg CaCl ₂ 19 mg MgCl ₂ ad 100 ml Aqua bidest., pH 7.2
Kaninchenserum Lösung	20%ige Lösung: 20 ml Kaninchenserum (Gibco BRL) ad 100 ml PBS
Karnovsky-Fixans	Lösung A: 2 g Paraformaldehyd in 25 ml Aqua bidest.

auf 60-70° C erhitzen,

2-3 Tr. 1 N NaOH nach Abkühlen

Lösung B: 1,5 g Cacodylat

in 24,5 ml Aqua bidest.

0,5 ml 25% Glutaraldehyd

25 mg CaCl₂

Lösung A und B mischen, auf pH-Wert von 7,2 einstellen

Na₂CO₃-Puffer 7,5 g Na₂CO₃ (Gibco BRL)

in 100 ml Aqua bidest.

NaN₃-Lösung 20 mg NaN₃ (Merck):

ad 100 ml PBS (= 0,02%ige Lösung)

Neutralrot-Lösung 0,1 g Neutralrot (Merck):

ad 400 ml PBS

NP 40 Nonidet P40 (Sigma Chemie)

PBS Phosphate Buffered Saline:

Reagenzien von Merck

8 g NaCl

0,2 g KCl

1,15 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O

0,2 g K₂HPO₄

0,1 g MgCl₂ x 6 H₂O

0,1 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

ad 1000 ml Aqua bidest.

pH-Wert einstellen 7,0-7,2

PEG 8000 Polyethylenglykol Molgew. 8000 g/mol (Sigma Chemie)

pNPP-Puffer 1 M Diethanolamin (Merck)

0.5 mM MgCl_2 (Merck)

pH-Wert einstellen 9.8

R-Puffer 10 mM Tris-HCl Puffer (Serva)

0,2 M MgCl_2 (Merck)

10% Gew./Vol. Glycerin (Merck)

pH-Wert einstellen 7,0-7,2

Sucrose-Lösung 5% bzw. 20%ige (Gew./Vol.) Lösung:

5 g bzw. 20 g RNase-freie Sucrose (Schwarz/Mann)

ad 100 ml R-Puffer

TCA Trichloressigsäure:

1 kg TCA (Merck) lösen in 454 ml Aqua bidest.

= 100% (Gew./Vol.) Lösung

TWEEN-20 TWEEN-20 (Aldrich-Chemie)

2.4. Zellen

2.4.1. HeLa-Zellen

HeLa-Wis-Zellen (Stamm Wisconsin) wurden von Prof. Dr. R. Rueckert (Madison, Wisconsin, USA) zur Verfügung gestellt und stellen eine permanente Zelllinie aus einem humanen Cervix-Karzinom dar. Sie verfügen über den Virusrezeptor ICAM-1 und sind mit HRV-14 infizierbar. HeLa-Wis-Zellen wurden als Einschichtkultur in Plastik-Zellkulturflaschen (175 cm²) (Costar) angezüchtet (Zeichhardt, 1991; Barnert et al., 1992). Das Wachstumsmedium bestand aus sterilem Eagle's Minimum Essential Medium (MEM; Gibco BRL), pH 7,0-7,2 mit obigen Zusätzen (s. 2.2) und 5% (Vol./Vol.) hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FKS) (Gibco BRL). Die Kulturflaschen wurden mit einem Invert-Lichtmikroskop (Leitz) auf ihre Zelldichte untersucht. Alle 2 bis 3 Tage wurden die konfluenten Zellen einer Kulturflasche in neuem Medium auf 3 neue Flaschen verteilt. Nach Absaugen des Wachstumsmediums wurden die Zellen mit 10 ml EDTA 2-3 min bei 37°C inkubiert, wodurch sich die Haftung der Zellen an den Boden verminderte, sie sich jedoch noch nicht völlig lösten. Die EDTA-Lösung wurde bis auf 1-2 Tropfen abgesaugt und die Zellen durch Schläge mit der Hand an die Kulturflasche gelöst. Die Zellsuspension wurde mit 10 ml vorgewärmtem Eagle's MEM mit 5% (Vol./ Vol.) FKS versetzt und in je 3 ml auf 3 Kulturflaschen mit je 75 ml Eagle's MEM mit 5% (Vol./Vol.) FKS verteilt. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln bei 37°C.

2.4.2. BHK-Zellen

BHK21-Zellen (Baby Hamster Kidney Zellen, American Type Culture Collection, ATCC, CCL10) wurden als Einschichtkultur in Plastik-Zellkulturflaschen (175 cm²) (Costar) angezüchtet. Sie verfügen nicht über den zellulären Virusrezeptor ICAM-1

und sind daher nicht für HRV-14 empfänglich. Das Wachstumsmedium bestand aus sterilem Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (DMEM; Gibco BRL), pH 7,0-7,2 mit obigen Zusätzen (s. 2.2) und 5% (Vol./Vol.) hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FKS) (Gibco BRL). Die Kulturflaschen wurden mit einem Invert-Lichtmikroskop (Leitz) auf ihre Zelldichte untersucht. Alle 2 bis 3 Tage wurden die konfluenten Zellen einer Kulturflasche in neuem Medium auf 3 neue Flaschen verteilt. Nach Absaugen des Wachstumsmediums wurden die Zellen mit 5 ml Trypsin-Versen 1 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung bis auf 1-2 Tropfen abgesaugt und die Zellen durch Klopfen abgelöst. Die Zellsuspension wurde mit 10 ml vorgewärmtem Eagle's DMEM mit 5% (Vol./Vol.) FKS versetzt und in je 3 ml auf 3 Kulturflaschen mit je 75 ml Eagle's DMEM mit 5% (Vol./Vol.) FKS verteilt. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln bei 37°C.

2.4.3. BHK-ICAM-1-Zellen

BHK21-Zellen, die mit ICAM-1 transfiziert waren (BHK-ICAM-1-Zellen, zur Verfügung gestellt von Dr. Langner, Behring-Werke), wurden wie BHK-Zellen angezüchtet. Zusätzlich enthielt das Wachstumsmedium noch 0,5 µM Methotrexat (MTX) und 0,4 mg/ml Geneticin (G418) (Zettlmeissl et al., 1990).

2.4.3.1. Transfektion von BHK-Zellen mit ICAM-1

BHK21-Zellen wurden mit einem Vektorkonstrukt transfiziert, um ICAM-1 an ihrer Zelloberfläche zu exprimieren. Dieses Vektorkonstrukt π H3M-ICAM-1 enthielt das ICAM-1-Gen mit seinen 5 extrazellulären Domänen, die Transmembranregion und das zytoplasmatische Ende (Seed et al., 1987, Langner, unveröffentlichte Ergebnisse). Um eine stabile Transfektion von BHK-Zellen, die ICAM-1 an ihrer Oberfläche exprimierten, zu erhalten, wurde eine Kotransfektion von π H3M-ICAM-1 mit den Plasmiden

pSV2dhfr und pRMH140 (neo^r) mit Hilfe der Kalziumphosphat-Methode durchgeführt. Das Plasmid pSV2dhfr führt zur Expression von Dihydrofolat-Reduktase, die zur de novo-Synthese von Purinen benötigt wird und abhängig von Methotrexat (MTX) ist. Die zweite Selektion bestand in der Bildung einer Resistenz gegen Geneticin, die durch das Plasmid pRMH140 (neo^r) verursacht wurde. Transfizierte BHK-Zellen wurden durch ein Medium, das Methotrexat und Geneticin enthielt, doppelt selektiert. Die Expression vom ICAM-1 an der Zelloberfläche wurde mit monoklonalem Anti-ICAM-1 in einem ELISA kontrolliert (s. 2.11).

2.5. Propagierung von HRV-14 und Coxsackievirus A21

Für die Versuche wurde mit Humanem Rhinovirus Typ 14 (HRV-14) gearbeitet, das von Prof. R. Rueckert (Madison, Wisconsin, USA) zur Verfügung gestellt wurde.

Zur Virusherstellung wurden HeLa-Wis-Zellen von $2^{2/3}$ Zellkulturflaschen (175 cm² pro Flasche, =16 ml Zellsuspension) als Suspensionskultur in ein 500 ml Spinnergefäß (Drehals-Gefäß mit Schraubverschlüssen und beweglich aufgehängtem magnetischen Rührklöppel, Techne) mit 500 ml vorgewärmtem Spinner-Medium und 5% (Vol./Vol.) FKS überführt (Otto et al., 1985). Nach 2 Tagen Inkubation bei 37°C im Dunkeln und unter stetigem Rühren auf einem Magnetrührer erfolgte die Sedimentation der Zellen, das Absaugen des Mediums und das Auffüllen mit vorgewärmtem Spinner-Medium und 5% (Vol./Vol.) FKS auf das doppelte Volumen. Diese Prozedur wurde alle 2 Tage durchgeführt, bis ein Volumen von 6 Litern in 4 Spinnergefäßen erreicht war. Nach dem Absetzen der Zellen und dem Absaugen des Mediums wurden die Zellsuspensionen 8 min bei 900 rpm und 4°C (Christ Cryofuge, Heraeus) zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 100 ml Spinner-Medium resuspendiert. Mit einer Teilmenge der Suspension wurde anschließend in einer Neubauer Zählkammer (Leitz) mikroskopisch die Zellzahl bestimmt und auf das Gesamtvolumen hochgerechnet. Die Zellsuspension wurde in einem 500 ml Spinnergefäß mit 300 ml Spinner-Medium versetzt und mit 0,5% (Vol./Vol.) 1 M HEPES-Puffer versetzt. Dann erfolgte die Infektion

der Zellen mit HRV-14 mit einer m.o.i. (Infektionsdosis) von 10 p.f.u./ Zelle. Nach 30 min wurde 5% (Vol./Vol.) FKS zugegeben und die Suspension 24 Stunden bei 33°C, der optimalen Reproduktionstemperatur von HRV-14, unter ständigem Rühren inkubiert. Die Zellsuspension wurde nach Beobachtung eines kompletten zytopathischen Effekts (cpe) bei -20°C eingefroren.

Zur radioaktiven Markierung der viralen RNA wurden Zellen als Suspensionskultur in Spinnergefäßen, wie beschrieben, angezüchtet. Nach einer Zentrifugation bei 8 min bei 900 rpm und 4°C (Christ Cryofuge, Heraeus) wurde die Zellsuspension in 300 ml Spinner-Medium resuspendiert und in ein 500 ml Spinnergefäß überführt. Nach der Infektion der Zellen mit HRV-14 mit einer m.o.i. (Infektionsdosis) von 10 p.f.u./ Zelle wurde nach 30 min 5% (Vol./Vol.) FKS zugesetzt. Nach 3 Stunden erfolgte die Zugabe von 2 ml ³H-Uridin (5,6-³H-Uridin, Amersham-Buchler, spezifische Ausgangsaktivität 1 mCi/ml) und die Inkubation der Suspension bei 33°C unter ständigem Rühren. Nach dem Auftreten eines kompletten zytopathischen Effekts (cpe) wurde die Suspension bei -20°C eingefroren.

Coxsackievirus A21 (ATCC VR-850) wurde auf Monolayerkulturen von FL Amnion Zellen (ATCC CCL62) und HeLa-Wis-Zellen angezüchtet.

2.6. Hochreinigung von HRV-14

Die Reinigung von HRV-14 wurde nach der Methode von Abraham und Colonno (Abraham et al., 1988) durchgeführt. Diese Methode wurde sowohl für radioaktiv markiertes als auch für nicht markiertes Virus angewendet. Dazu wurden ca. 1500 ml Zellsuspension mit dem Überstandsvirus, die aus der in 2.5 beschriebenen Viruspropagierung stammten, eingesetzt. Nach dreimaligem Frieren und Tauen bei Zimmertemperatur wurde die Suspension von groben Zelltrümmern durch Zentrifugation befreit (8 min, 900 rpm und +4°C, Christ Cryofuge, Heraeus). Das im Überstand befindliche Virus wurde mit 7% (Gew./Vol.) PEG 8000 (Polyethylenglykol 8000; Serva) und 2,2% (Gew./ Vol.) NaCl versetzt und über Nacht bei +4°C unter Rühren ausgefällt.

Das Präzipitat wurde 55 min bei 2600 rpm und +4°C sedimentiert, mit ca. 6 ml eines Gemischs aus R-Puffer, 0,3% (Gew./Vol.) DOC und 0,6% (Vol./Vol.) NP 40 resuspendiert und mit einem Dounce-Homogenisator (B-Pistill, Gibco) homogenisiert (20 Schläge). Nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis wurde erneut mit demselben Dounce-Homogenisator homogenisiert (20 Schläge). Überschüssige zelluläre Membrantrümmer wurden für 5 min bei 3200 rpm und +4°C abzentrifugiert (Christ Cryofuge, Heraeus).

Der Überstand wurde auf zwei Sucrose-Gradienten (5-20% Gew./Vol. Sucrose in R-Puffer) geschichtet. Die Gradienten wurden mit einem Gradientenmischer (Hofer Scientific Instruments) in SW 27-Zentrifugenröhrchen (Volumen 38 ml) aus je 17 ml 5%iger und 20%iger (Gew./Vol.) Sucrose-Lösung hergestellt. Die Zentrifugation erfolgte im SW 27-Rotor (Beckman, 235 min bei 24000 rpm und +4°C). Nach der Zentrifugation befand sich die opalisierende Virusbande ungefähr in der Röhrchenmitte. Der Röhrchenboden wurde angestoßen und der Gradient unter gleichzeitiger UV-Bestimmung bei 254 nm fraktioniert (Fraktionssammler Model 328, UV-Einheit Model UA-5 Absorbance Monitor, Multiplexer-Expander Model 1133, Optical Unit Type 6, jeweils von ISCO). Nach Auswertung des Fraktionsprofils wurden die entsprechenden Virusfraktionen gesammelt und das Virus in einem 60Ti-Rotor (Beckman) für 14 Stunden bei 18000 rpm und +4°C sedimentiert. Das Sediment wurde in ca. 0,7 ml PBS resuspendiert, mit einem 1 ml-Dounce-Homogenisator (B-Pistill, Gibco) homogenisiert (20 Schläge) und bei 10 min, 2000 rpm und +4°C zentrifugiert.

Anschließend wurde der virushaltige Überstand bei -70°C gelagert. Teilmengen aus derartigen Präparationen wurden zur Bestimmung der Infektiosität entnommen (s 2.8).

2.7. RNA-Synthese-Test

Der RNA-Synthese-Test misst den Einbau des radioaktiven Nukleosids ³H-Uridin in die neusynthetisierte Virus-RNA innerhalb des ersten Reproduktionszyklusses nach einer Infektion von Zellen unter der Einwirkung von Actinomycin D, welches die zellu-

läre Transkription hemmt (Baltimore et al., 1963; Zeichhardt et al., 1985). Die gemessene Radioaktivität ist ein Maß für die neuproduzierte virale RNA und somit indirekt für die Aufnahme und das Uncoating der eingesetzten Viren, deren RNA zur Neusynthese diente.

In 24-Vertiefungs-Zellkulturschalen (Costar) wurde pro Vertiefung 0,4 ml einer HeLa-Wis-Zellsuspension mit 1×10^6 Zellen/ml auf 11 mm durchmessende gesäuberte und entfettete, sterile Glasplättchen gegeben und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium von den konfluenten Zellen abgesaugt und die Zellen mit 0,6 ml HRV-14-Viruslösung (ca. 3×10^7 p.f.u./ml) in Gegenwart von Actinomycin D (3×10^{-3} ml Stammlösung/ml = 3 µg/ml) infiziert. Die eingesetzte Infektionsdosis lag bei 18 m.o.i.. Nach einer Infektionszeit von 30 min bei 33°C und 2% CO₂ wurde das Inokulum abgesaugt. Zu den Zellen wurde 0,3 ml vorgewärmtes Eagle's MEM mit 5% (Vol./Vol.) FKS und Actinomycin D gegeben. Nach jeweils 5, 6 und 7 Stunden p.i. (post infectionem) bei 33°C und 2% CO₂ wurden die Ansätze für 1 Stunde mit ³H-Uridin radioaktiv markiert. Dazu wurden 10 µl einer ³H-Uridin-Lösung (5,6-³H-Uridin, Amersham-Buchler, spezifische Ausgangsaktivität 1 mCi/ml, 1:5 verdünnt in Eagle's MEM) zu den entsprechenden Zeiten gegeben (spezifische Aktivität im Test: 2 µCi/Ansatz). Nach 1 Stunde Einbauzeit wurde der Zellüberstand abgesaugt und die Plättchen in den Vertiefungen zweimal mit je 0,4 ml vorgewärmtem PBS gewaschen. Nach dem Absaugen wurden die Plättchen mit einer Pinzette in 24-Vertiefungs-Zellkulturschalen mit je 2 ml eiskalter 10%iger (Vol./Vol.) Trichloressigsäure (TCA) pro Vertiefung zur Präzipitation der RNA überführt. Nach 20 min wurden die Plättchen dreimal durch eiskalte 10%ige (Vol./Vol.) TCA-Lösung gezogen und in ein Szintillationsröhrchen (Minivals, Packard Instruments) mit 0,4 ml Soluene (Packard Instruments) überführt. Anschließend wurden die Szintillationsröhrchen für 20 min auf 65°C erhitzt und nach dem Abkühlen mit 2 ml Szintillationsflüssigkeit (Dimilume, Packard Instruments) versetzt. Die Radioaktivität wurde im Szintillationszähler (Minaxi Tricarb 4000 Series, Packard Instruments) gemessen.

Bei der Messung der viralen RNA-Synthese in BHK- und BHK-ICAM-1-Zellen wurde analog verfahren. Die Zelleinsaat betrug hier 0,4 ml einer Zellsuspension mit 2×10^6 Zellen/ml.

Zur Messung der zellulären RNA-Synthese wurde eine Infektion mit 0,6 ml Eagle's MEM in Abwesenheit von HRV-14 durchgeführt (Mock=Schein-Infektion). Sonstige unspezifische Einbautätigkeiten ('Background'-Messung) wurden durch eine Mock-Infektion mit der gleichen Menge Eagle's MEM mit Actinomycin D erfasst. Nach der Mock-Infektion wurden diese Lösungen durch 0,3 ml Eagle's MEM mit bzw. ohne Actinomycin D ersetzt. Der weitere Versuchsablauf erfolgte analog zur normalen Versuchsdurchführung.

2.7.1. RNA-Synthese-Inhibitions-Test

Der RNA-Synthese-Inhibitions-Test beruht auf dem RNA-Synthese-Test und misst die Verminderung der viralen RNA-Neusynthese, die durch die Vorinkubation der Zellen mit Anti-ICAM-1 oder Vorinkubation von HRV-14 mit ICAM-1:Immunglobulin (ICAM-1:Ig) bedingt ist. Diese Abnahme ergab sich aus dem Vergleich der Infektiositäten mit vorbehandelten Ansätzen und Ansätzen ohne Vorbehandlung, d.h. ohne Anti-ICAM-1 oder ICAM-1:Ig.

Die Einsaat der Zellen erfolgte wie beim RNA-Synthese-Test. Alle Ansätze wurden dreifach durchgeführt.

Bei der Blockierung von zellulärem ICAM-1 mit Anti-ICAM-1 erfolgte die Vorinkubation der Zellen mit 600 µl einer Anti-ICAM-1-Lösung (0,12, 0,37, 1,1, 3,3, 10 µg/ml Endkonzentration) bei 33°C und 2% CO₂ für 1 Stunde. Nach dem Absaugen der Lösung wurde die Infektion der Zellen mit einer Virusverdünnung (ca. 3×10^7 p.f.u.) wie beim RNA-Synthese-Test durchgeführt.

Bei der Blockierung von HRV-14 mit ICAM-1:Immunglobulin (ICAM-1:Ig) erfolgte die Vorinkubation des Virus mit einer ICAM-1:Ig-Lösung (0,05, 0,47, 4,67, 14 µg/ml Endkonzentration) bei 33°C und 2% CO₂ für 1 Stunde. Mit diesem Ansatz wurde die Infektion der Zellen wie beim RNA-Synthese-Test durchgeführt. Als Positiv-Kontrolle diente

eine Vorinkubation des Virus mit Anti-HRV-14 (1:500 verdünnt) anstelle von ICAM-1:Ig.

Nach der Virusinkubation erfolgte die Markierung der Zellen von der 5. bis 7. Stunde p.i. für jeweils 1 Stunde Dauer mit ^3H -Uridin. Nach dem Waschen und Präzipitation der Zellen wurde die Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt.

Die Bestimmung der Infektiosität der eingesetzten HRV-14-Lösung erfolgte wie beim Plaque-Reduktions-Test ohne Vorinkubation mit Anti-ICAM-1-Lösung oder ICAM-1:Ig-Lösung. Diese Infektiosität diente als Bezugsgröße (100%-Wert). Das Verhältnis aus den einzelnen Infektiositätswerten und dieser Bezugsgröße beschrieb die prozentuale Stärke der Inhibition von Anti-ICAM-1 oder ICAM-1:Ig.

2.8. Plaque-Test

Zur Messung der Virusinfektiosität und Bestimmung infektiöser Virusnachkommenchaft wurde der Plaque-Test benutzt. Er beruht auf der Bildung von makroskopisch sichtbaren Plaques (Infektionshöfe) in einem konfluenten Zellrasen (Dulbecco, 1952; Zeichhardt et al., 1981; Willingmann et al., 1989). Die Plaques entstehen durch den zytopathischen Effekt, der nach der Infektion der primär infizierten Zellen in den benachbarten Zellen durch die Infektion mit neugebildeten Viren während mehrerer viraler Reproduktionszyklen (2-3 Tage) auftritt. Die Zahl der Plaques ist ein Maß der Infektiosität der untersuchten Viruslösung.

In jede Vertiefung von 12-Vertiefungs-Zellkulturschalen (Costar) wurde 1 ml einer HeLa-Wis-Zellsuspension mit einer Zellzahl von 6×10^5 Zellen/ml gegeben und über Nacht bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Am nächsten Tag wurde von den konfluent ausgewachsenen Zellen das Medium abgesaugt. Zu den Zellen wurde 0,1 ml einer Verdünnung der zu untersuchenden HRV-14-Lösung gegeben. Die Virusinkubation dauerte 30 min bei den optimalen Bedingungen für HRV-14 von 33°C und 2% CO_2 . Nach Absaugen des Inokulums wurden die Zellen mit 1 ml einer auf 40°C vor-

gewärmten Agar-Lösung vorsichtig überschichtet. Dazu wurde eine 0,8%ige Agarlösung hergestellt und durch Aufkochen gelöst. Zu einem Teil dieser Lösung wurden drei Teile vorgewärmtes Eagle's Overlay Mediums mit 10% (Vol./ Vol.) FKS und 5% (Vol./Vol.) 1 M HEPES hinzugefügt.

Die Schalen wurden nach Abkühlen und Erstarren des Agars für 3 Tage bei 33°C und 2% CO₂ inkubiert, dann mit 1 ml Neutralrotlösung (0,1 g auf 400 ml PBS-Puffer) gefärbt und die Plaques ausgezählt. Die Plaquezahl wurde durch das Volumen (0,1 ml) und den Verdünnungsfaktor der eingesetzten Virusverdünnung dividiert. Das Ergebnis gibt die Infektiosität in p.f.u./ml an.

Bei der Messung der Infektiosität in BHK- und BHK-ICAM-1-Zellen wurde analog verfahren. Die Zelleinsaat betrug hier 1 ml einer Zellsuspension mit 8×10^5 Zellen/ml.

Als Kontrolle des Zellwachstums wurde eine Schein-Infektion (Mock-Infektion) mit 0,1 ml Eagle's MEM anstelle der Viruslösung durchgeführt.

2.8.1. Plaque-Reduktions-Test

Der Plaque-Reduktions-Test beruht auf dem Plaque-Test und misst die Abnahme der Infektiosität, die durch die Vorinkubation der Zellen mit Anti-ICAM-1 oder Vorinkubation von HRV-14 mit ICAM-1:Immunglobulin (ICAM-1:Ig) bedingt ist. Diese Abnahme ergab sich aus dem Vergleich der Infektiositäten mit vorbehandelten Ansätzen und Ansätzen ohne Vorbehandlung, d.h. ohne Anti-ICAM-1 oder ICAM-1:Ig.

Die Zellen wurden wie beim Plaque-Test angesetzt. Alle Ansätze wurden dreifach durchgeführt.

Bei der Blockierung von zellulärem ICAM-1 mit Anti-ICAM-1 erfolgte die Vorinkubation der Zellen mit 250 µl einer Anti-ICAM-1-Lösung bei 33°C und 2% CO₂ für 1 Stunde. Nach dem Absaugen der Lösung wurde die Infektion der Zellen mit einer Virusverdünnung (0,1 ml mit einer Infektiosität von 5×10^7 p.f.u./ml) wie beim Plaque-Test durchgeführt.

Bei der Blockierung von HRV-14 mit ICAM-1:Immunglobulin (ICAM-1:Ig) erfolgte die Vorinkubation des Virus mit einer ICAM-1:Ig-Lösung bei 33°C und 2% CO₂ für 1 Stunde. Mit diesem Gemisch wurde die Infektion der Zellen wie beim Plaque-Test durchgeführt.

Nach der Virusinkubation erfolgte die Überschichtung der Zellen mit einer Agar-Lösung. Nach weiterer Inkubation der Schalen über 3 Tage erfolgte die Bestimmung der Infektiosität durch Anfärben und Auszählen der Plaques. Die Plaquezahl wurde durch das eingesetzte Virusvolumen (0,1 ml) dividiert und ergab die Infektiosität in p.f.u./ml.

Die Bestimmung der Infektiosität der eingesetzten HRV-14-Lösung erfolgte ohne Vorinkubation mit Anti-ICAM-1-Lösung oder ICAM-1:Ig-Lösung. Diese Infektiosität diente als Bezugsgröße (100%-Wert). Das Verhältnis aus den einzelnen Infektiositätswerten und dieser Bezugsgröße beschrieb die prozentuale Stärke der Inhibition von Anti-ICAM-1 oder ICAM-1:Ig.

Als Positiv-Kontrolle der Inhibition durch ICAM-1:Immunglobulin erfolgte die Inkubation des Virus mit einer Anti-HRV-14-Lösung in einer Endkonzentration von 1:500.

2.9. Endpunktstirration

Zur Bestimmung der halbmaximalen Infektionsdosis (ID₅₀) von HRV-14 wurde die Endpunktstirration benutzt. Sie beruht auf der halbquantitativen mikroskopischen Auswertung des zytopathischen Effekts nach einer Infektion mit dem zu untersuchenden Virus. Die Virus-Verdünnung, bei der 50% der Zellen einen zytopathischen Effekt zeigen, ergibt die ID₅₀, ihre Berechnung erfolgte nach der Methode von Reed und Muench (Reed et al., 1938; Zeichhardt, 1992).

In jede Vertiefung von 96-Vertiefungs-Zellkulturschalen (Costar) wurde 100 µl einer Zellsuspension (HeLa-Wis-Zellen mit einer Zellzahl von 2,5x10⁵ Zellen/ml, BHK- und BHK-ICAM-1-Zellen mit einer Zellzahl von 7,5x10⁵ Zellen/ml) gegeben und über Nacht

bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurde von den konfluent ausgewachsenen Zellen das Medium abgesaugt. Von HRV-14 und Coxsackievirus A21 wurde eine Verdünnungsreihe von 10⁰ bis 10⁻⁶ hergestellt. Zu den Zellen wurde 25 µl der Viruslösung gegeben. Die Virusinkubation dauerte 30 min bei 37°C und 2% CO₂. Nach Absaugen des Inokulums wurden die Zellen mit 150 µl Zellmedium (MEM-, bzw. DMEM-Medium, s. 2.4.1 und 2.4.2) versetzt. Nach 24 Stunden wurde bei den verschiedenen Virusverdünnungen mikroskopisch der entstandene zytopathische Effekt graduell in 4 Abstufungen (++++=100%, +++=75%, ++=50%, +=25% geschädigter Zellen) beurteilt. Anschließend wurde für jede Verdünnungsreihe aus den Abstufungen der prozentuale Anteil infizierter Kulturen berechnet. Eine logarithmische Mittelwertbildung aus den Virusverdünnungen oberhalb und unterhalb von 50% infizierter Kulturen, ergab die Verdünnung, bei der die halbmaximale Infektionsdosis ID₅₀ lag.

2.10. Elektronenmikroskopie

Zur Beobachtung der Virusaufnahme in die Zelle wurden von infizierten HeLa-Wis-, BHK- und BHK-ICAM-1-Zellen Ultradünnschnitte für die Transmissionselektronenmikroskopie angefertigt (Baltimore et al., 1963; Zeichhardt et al., 1985).

In 24-Vertiefungs-Zellkulturschalen (Costar) wurden auf 11 mm durchmessende gesäuberte und entfettete, sterile Glasplättchen pro Vertiefung 4x10⁵ HeLa-Wis-Zellen bzw. 8x10⁵ BHK- oder BHK-ICAM-1-Zellen gegeben und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium von den konfluenten Zellen abgesaugt und die Zellen auf 4°C vorgekühlt. Anschließend erfolgte die Infektion mit hochgereinigtem HRV-14 in einer Infektionsmultiplizität (m.o.i.) von 1000 plaque-forming-unit (p.f.u.) pro Zelle für 2 h bei 4°C. Zum Nachweis der Virusadsorption wurde die Temperatur bei 4°C belassen. Zur Virusaufnahme erfolgte eine Inkubation der Zellen mit dem Virus bei 33°C für 30 min. Dann wurde das Inokulum abgesaugt und die Zellen wurden dreimal mit dem jeweiligen Wachstumsmedium (s. 2.4) gewaschen. Anschließend wurde 300 µl Wachstumsmedium zu den Zellen gegeben. Nach den entsprechenden

Zeiten (5 min, 30 min, 12 h und 18 h p.i.) erfolgte nach dem Absaugen des Mediums die Fixation der Zellen mit 2 ml Karnovsky-Fixans. Nach 30 min wurde das Fixans entfernt und die Proben mehrmals mit Imidazol-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 1% (w/v) Osmiumtetroxid (Serva) in Cacodylat-Puffer. Nach einem erneuten Waschvorgang mit Imidazol-Puffer und einer Nachbehandlung mit 1% (w/v) Tannin in Cacodylat-Puffer wurde eine Entwässerung der Proben über eine Ethanol-Reihe von 50%, 70%, 96% und 100% Ethanol vorgenommen. Dann wurden die Proben in Vinylcyclohexendioxid (Serva, Heidelberg) eingebettet und nach Aushärten des Kunststoffes in einem Ultramikrotom (Ultracut, Reichert, Bielefeld) Ultradünnschnitte mit einer Schichtdicke von 400 – 800 Å angefertigt. Die Nachkontrastierung erfolgte mit 6%igem alkoholischen Uranylacetat und Bleicitrat nach der Methode von Reynolds. Die Analyse der Virusaufnahme erfolgte in einem Transmissions-elektronenmikroskop.

2.11. ELISA zum Nachweis von membranständigem ICAM-1 (ICAM-1-ELISA)

Der ICAM-1-ELISA misst mit Antikörpern gegen ICAM-1 den Gehalt von membranständigem ICAM-1 an Zelloberflächen.

In 96-Vertiefungs-Zellkulturschalen (Costar) wurden 100 µl einer Zellsuspension mit 3×10^5 Zellen pro ml pro Vertiefung eingesät (Barnert et al., 1991). Nach einer Inkubation von 3 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellüberstände vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit 100 µl 2,5%igem neutral gepuffertem Formaldehyd (NBF, Sigma) fixiert. Nach 20 min Schütteln auf einem Elektroschüttler (Hoefer Scientific Instruments) wurde die Lösung abgegossen. Danach wurde zweimal mit 200 µl PBS pro Vertiefung gewaschen. Zur Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen wurden die Platten mit 150 µl Kaninchen-Serum-Lösung (20%iges Kaninchenserum in PBS) pro Vertiefung für 1 Stunde bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Nach Abgießen der Lösung wurde Anti-ICAM-1 in Kaninchen-Serum-Lösung (Konzentration 1 µg/ml, 100 µl pro Vertiefung) zugesetzt. Der gegen humanes ICAM-1 ge-

gerichtete Antikörper stammte aus der Maus (Biermann). Nach 1 Stunde Inkubationszeit bei 37°C in einer feuchten Kammer wurden die Überstände abgesaugt und die Zellen viermal mit 150 µl PBS/0,05% (Vol./Vol.) TWEEN-20 unter Schütteln auf einem Elektroschüttler gewaschen. Der gegen Maus-Antikörper gerichtete, mit alkalischer Phosphatase markierte Helferantikörper vom Kaninchen (Sigma) wurde in einem Volumen von 100 µl und einer Verdünnung von 1:1000 in Kaninchen-Serum-Lösung zugegeben. Nach 1 Stunde Inkubationszeit bei 37°C in einer feuchten Kammer wurden die Überstände abgesaugt und erneut viermal mit 200 µl PBS/0,05% (Vol./Vol.) TWEEN-20 gewaschen. Es wurden 100 µl pNPP-Lösung (1 Tablette para-Nitrophenolphosphat (20 mg; Sigma) in 20 ml pNPP-Puffer) zu jedem Ansatz pipettiert. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde die Platte photometrisch bei 405 nm in einem UV-Meter für Mikrotiterplatten (Titertek Multiscan MCC 341, Flow Laboratories GmbH) vermessen.

Eine Wirkung von Zellmembrankomponenten auf die Färbelösung mit einer unspezifische Umsetzung des Substrats (Background-Wert) wurde durch die Zugabe von Kaninchen-Serum anstelle von Helfer-Antikörper ermittelt. Die in den Grafiken aufgeführten Extinktionswerte ergaben sich aus der Differenz des eigentlichen Messwertes und diesem Background-Wert. Zur Messung von unspezifischer Bindung des eingesetzten Helfer-Antikörper wurde Anti-ICAM-1 durch Kaninchen-Serum-Lösung ersetzt.

2.12. ELISA zum Nachweis von zellgebundenem HRV-14 (HRV-14-ELISA)

Der HRV-14-ELISA misst mit Anti-HRV-14 aus dem Meerschweinchen den Gehalt von HRV-14, das auf Zellen gebunden ist (Barnert et al., 1991; Barnert et al., 1992). Durch die Anordnung von Zellen, HRV-14 und Anti-HRV-14 wird die Art des ELISAs auch als Sandwich-ELISA bezeichnet. Als Helfer-Antikörper diente ein mit alkalischer Phosphatase (AP) markierter, gegen Meerschweinchen-Antikörper gerichteter Antikörper aus dem Kaninchen.

In 96-Vertiefungs-Zellkulturschalen (Costar) wurden 100 µl einer Zellsuspension mit 3×10^5 Zellen pro ml pro Vertiefung eingesät. Nach einer Inkubation von 3 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellüberstände vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit 100 µl 2,5%igem neutral gepuffertem Formaldehyd (NBF, Sigma) fixiert. Nach 20 min Schütteln auf einem Elektroschüttler (Hoefer Scientific Instruments) wurde die Lösung abgegossen. Danach wurde zweimal mit 200 µl PBS pro Vertiefung gewaschen. Zur Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen wurden die Platten mit 150 µl Kaninchen-Serum-Lösung (20%iges Kaninchenserum in PBS) pro Vertiefung für 1 Stunde bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach Abgießen der Lösung wurde HRV-14 in Kaninchen-Serum-Lösung (10^6 p.f.u./ml, 100 µl pro Vertiefung) zugesetzt. Nach 1 Stunde Inkubationszeit bei 33°C in einer feuchten Kammer wurde ungebundenes Virus abgesaugt und die Zellen viermal mit 200 µl PBS/0,05% (Vol./Vol.) TWEEN-20 unter Schütteln auf einem Elektroschüttler gewaschen.

Um eine unspezifische Bindung von Anti-HRV-14 an die Zelloberfläche zu verhindern und kreuzreagierende Oberflächenkomponenten zu blockieren, wurde eine Absättigung der Zellen mit einer verdünnten Anti-HRV-14-Lösung durchgeführt. 20 ml einer Verdünnung von Anti-HRV-14 von 1:2000 in Kaninchen-Serum-Lösung wurden in eine mit HeLa-Wis-Zellen bewachsene Zellkulturflasche (175 cm²) nach Absaugen des Mediums gegeben. Nach Inkubation über Nacht unter Schütteln bei +4°C wurde die Lösung abpipettiert, für 20 min bei 4000 rpm (Christ Cryofuge, Heraeus) zentrifugiert und der Überstand bei -20°C gelagert.

Bei dem Ansatz mit den fixierten Zellen, an die HRV-14 adsorbiert war, wurde in jede Vertiefung nach Abgießen der Lösung 100 µl Anti-HRV-14 in Kaninchen-Serum-Lösung (Verdünnung 1:8000) zugesetzt. Nach 1 Stunde Inkubationszeit bei 37°C in einer feuchten Kammer wurden die Überstände abgesaugt und die Zellen viermal mit 200 µl PBS/0,05% (Vol./Vol.) TWEEN-20 unter Schütteln auf einem Elektroschüttler gewaschen. Der mit alkalischer Phosphatase markierte Helfer-Antikörper vom Kaninchen (Sigma) wurde in einem Volumen von 100 µl und einer Verdünnung von 1:1000 in Kaninchen-Serum-Lösung zugegeben. Nach 1 Stunde Inkubationszeit bei 37°C in einer feuchten Kammer wurden wieder die Überstände abgesaugt und erneut viermal

mit 200 µl PBS/0,05% (Vol./Vol.) TWEEN-20 gewaschen. Die Detektion des gebundenen Antikörpers erfolgte wie im ICAM-1-ELISA (s. 2.11).

Zur Messung einer Wirkung von Zellmembrankomponenten auf die Färbelösung (unspezifische Umsetzung des Substrats) wurde der Helfer-Antikörper durch 100 µl Kaninchen-Serum-Lösung ersetzt. Die in den Grafiken aufgeführten Extinktionswerte ergaben sich aus der Differenz des eigentlichen Messwertes und diesem Background-Wert. Zur Messung von unspezifischer Bindung des eingesetzten Helfer-Antikörper wurde Anti-HRV-14 durch Kaninchen-Serum-Lösung ersetzt. Unspezifische Bindungen des eingesetzten Anti-HRV-14 wurden durch Ersatz von HRV-14 durch die entsprechende Menge an Kaninchen-Serum-Lösung detektiert.

2.13. Gradientenzentrifugation

In der Gradientenzentrifugation sollte untersucht werden, ob HRV-14 und ICAM-1:Ig antigen-antikörperartige Komplexe bilden können. Dazu wurde HRV-14 in Gegenwart von ³H-Uridin in HeLa-Zellen angezüchtet (s. 2.5) und radioaktiv markiert. Dann erfolgte die Hochreinigung nach der Methode von Abraham und Colonno (Abraham et al., 1988).

20 µl hochgereinigtes ³H-HRV-14 wurde mit ICAM-1:Immunglobulin (Endkonzentration 14 µg/ml) für 1 Stunde bei 33°C inkubiert. Als Kontrolle wurde die gleiche Menge ³H-HRV-14 allein zentrifugiert und anschließend in die gleiche Anzahl von Fraktionen wie der Ansatz aus ³H-HRV-14 und ICAM-1:Ig aufgetrennt. Zur Kontrolle auf unspezifische Reaktionen wurde außerdem die Inkubation von Protein A mit ³H-HRV-14 allein bzw. mit ³H-HRV-14 und ICAM-1:Ig durchgeführt. Bei einer Komplexbildung von HRV-14 und ICAM-1:Ig sollten die Komplexe durch Protein A präzipitiert werden können.

Die unterschiedlichen Ansätze wurden auf einen Sucrose-Gradienten (5-20% Gew./Vol. Sucrose in R-Puffer) geschichtet. Der Gradient wurde mit einem Gradientenmischer (Hoefer Scientific Instruments) in SW 65-Zentrifugenröhrchen aus je 7 ml

5%iger und 20%iger (Gew./Vol.) Sucrose-Lösung hergestellt. Die Zentrifugation erfolgte im SW 65-Rotor (Beckman, 25 min bei 40000 rpm und +4°C). Der Röhrenboden wurde angestochen und der Gradient unter gleichzeitiger UV-Bestimmung bei 254 nm zu je 3 Tropfen pro Fraktion fraktioniert (Fraktionssammler Model 328, UV-Einheit Model UA-5 Absorbance Monitor, Multiplex-Expander Model 1133, Optical Unit Type 6, jeweils von ISCO). Zur Aufnahme eines Fraktionsprofils wurde die Radioaktivität der entsprechenden Virusfraktionen gemessen. Anschließend wurde die Lage des Gipfel-Maximums bestimmt und mit den jeweiligen Maxima der Kontrollen (³H-HRV-14 allein, ³H-HRV-14 mit Protein A) verglichen.

2.14. Die Markierung viraler Proteine mit ³⁵S-Methionin

Zur Markierung von Virusproteinen mit ³⁵S-Methionin erfolgte die Anzucht der Zellen als Monolayerkulturen auf sterilen Glasplättchen, wie im RNA-Synthese-Test (s. 2.7) beschrieben. Nach der Entfernung des Mediums wurden die Zellen mit 0,6 ml HRV-14-Viruslösung (ca. 3×10^7 p.f.u./ml) in Gegenwart von Actinomycin D infiziert. Nach einer Infektionszeit von 30 min bei 33°C und 2% CO₂ wurde das Inokulum abgesaugt. Zu den Zellen wurde 0,3 ml vorgewärmtes methioninfreies Eagle's MEM mit 5% (Vol./Vol.) FKS und Actinomycin D gegeben. Nach jeweils 5, 6 und 7 Stunden p.i. (post infectionem) bei 33°C und 2% CO₂ wurden die Ansätze radioaktiv markiert (Yin et al., 1983). Dazu wurden 10 µl einer ³⁵S-Methionin-Lösung (5,6-³H-Uridin, Amersham-Buchler, spezifische Ausgangsaktivität 1 mCi/ml, 1:5 verdünnt in Eagle's MEM) zu den entsprechenden Zeiten gegeben (spezifische Aktivität im Test: 2 µCi/Ansatz). Nach 1 Stunde Einbauzeit wurde der Zellüberstand abgesaugt und die Plättchen in den Vertiefungen zweimal mit je 0,4 ml vorgewärmtem PBS gewaschen. Die weitere Vorgehensweise erfolgte wie im RNA-Synthese-Test (s. 2.7) beschrieben.

2.15. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der ³⁵S-markierten zellulären und viralen Proteine nach ihrem Molekulargewicht wurde nach Laemmli (Laemmli, 1970) und weiteren Modifikationen (Barnert et al., 1991) mit 10%igen Trenn- und 4%igen Sammelgelen durchgeführt. Die Trennung wurde mit vertikalen Flachbettgelen durchgeführt.

Für die Auftrennung von Zell-Lysaten oder Virusproteinen wurden zuerst Membranproteine durch Inkubation mit Triton X100 (Endkonzentration: 2%) für 20 Minuten bei 45°C gelöst. Die auf Raumtemperatur abgekühlten Proben wurden dann mit DNase I (Sigma; Endkonzentration: 50 µg/ml) versetzt und für 10 min bei 4°C inkubiert. Der Verdau zellulärer bzw. viraler DNA wurde anschließend durch Zugabe von kristallinem Harnstoff (Serva, Heidelberg; Endkonzentration: 0,89 mg/ ml) beendet. Natrium-Laurylsulfat (SDS) wurde in einer Endkonzentration von 2% dazugegeben und die Proben ggf. durch Zugabe von β-Mercaptoethanol (Endkonzentration: 5%) reduziert. Die Proben wurden für 5 Minuten bei 100°C inkubiert und vor dem Auftrag in die Taschen des Sammelgels mit Bromphenolblau versetzt.

Das Trenngel enthielt neben 10% Acrylamid 0,28% Methylen-Bisacrylamid, 0,35 M Tris/HCl pH 8,8, 0,06% TEMED, 0,1% SDS und 0,05% Ammoniumpersulfat. Das Sammelgel enthielt 4% Acrylamid, 0,1% Methylen-Bisacrylamid und 0,125 M Tris/HCl pH 6,8. Die Konzentrationen der übrigen Substanzen entsprachen denen im Trenngel. Vor der Zugabe der Komponenten TEMED und Ammoniumpersulfat wurde der Gelansatz 15 Minuten entgast. Zum Auftrag der Proben wurde in das noch nicht polymerisierte Sammelgel ein Teflon-Kamm zur Formung von Auftragstaschen eingesetzt, der nach der Polymerisation des Gels und Einbau in die Elektrophorese-Kammer entfernt wurde. Die elektrophoretische Auftrennung wurde in einer 'Protean II' vertikal Flachgel-Elektrophorese Kammer (BioRad) durchgeführt. Als Molekulargewichtsmarker wurden ¹⁴C-Molekulargewichtsmarker (Amersham-Buchler, Braunschweig) mit den Molekulargewichten 14,3, 30, 46, 68, 92,5 und 200 kD verwendet. Der verwendete Elektrophorese-Puffer enthielt 20mM Tris (pH 8,3), 192 mM Glycin und 0,1% (w/v) SDS. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem dreistufigen Programm: 60 min bei 20 mA, 16 Stunden bei 6 mA und ca. 60 min bei 30 mA. Das Ende

der Auftrennung wurde durch Erreichen des als Laufindikator den Proben zugesetzten Bromphenolblaus angezeigt. Als Stromversorgungsgerät diente hierbei ein programmierbares BioRad-3000i. Die aufgetrennten Proteine wurden durch Fluorographie sichtbar gemacht (Sawitzky et al., 1990). Dazu wurden die Gele im Anschluss an den Trennungslauf für 90 Minuten in DMSO entwässert. Dabei wurde das DMSO einmal gewechselt. Nach vollständiger Entwässerung wurden die Gele für 2,5 Stunden in einer 33,3%igen (w/v) PPO-Lösung in DMSO bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln inkubiert. Danach wurde die PPO-Lösung dekantiert und das in die Gele eindiffundierte PPO durch Wässern der Gele ausgefällt. Da DMSO die Fluorographie empfindlich stört, wurden die Gele für weitere 30 Minuten gewässert. Dabei erlangten sie gleichzeitig ihre ursprünglichen Abmessungen wieder, die sie durch Schrumpfen beim Entwässern verloren hatten. Die Gele wurden schließlich für 3 Stunden bei 80°C auf einem BioRad-Geltrockner auf einem Filterpapier getrocknet. Die vollständig getrockneten Gele wurden dann auf Röntgenfilm Kodak Xomat-AR aufgelegt und bis zur Entwicklung bei -70°C eingefroren. Der Film wurde dann mit einer 1:10 verdünnten Entwickler-Lösung (Ilford PQ) für 5 Minuten entwickelt, anschließend für weitere 5 Minuten mit Tetanal Express-Fixiersalz fixiert und nach Wässerung (30 Minuten) getrocknet.