

5 Material

5.1 Bakterienstämme

Name	Nr. (Stammsammlung)	Genotyp/Beschreibung
------	---------------------	----------------------

5.1.1 *E. coli*

<u>DH5α</u>	E75	<i>endA1</i> , F ⁻ , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> , (<i>r_K</i> ⁻ , <i>m_K</i> ⁺), <i>lacZ</i> Δ M15, <i>recA1</i> , <i>supE44</i> , λ ⁻ , <i>deoR</i> , <i>thi</i> ⁻ 1, ϕ 80d, D(<i>lacZYA-argF</i>) U169
<u>UT2300</u>	E149	F ⁻ <i>ara-14 leuB6 azi-6 lacY1 proC14 tsx-67 entA403 trpE38 rfbD1 rpsL109 xyl-5 mtl-1 thi1</i>
<u>JK321</u>	E151	UT2300 Δ (<i>ompT-fepC266</i>) <i>zih::Tn10 dsbA::kan</i>
<u>JCB571</u>	E155	<i>araD139</i> Δ (<i>araABC-leu</i>)7679 <i>galU galK</i> Δ (<i>lac</i>)X74 <i>rpsL thi phoR zih12::Tn10 dsbA::kan1</i>
<u>BL-21cod.⁺</u>	E224	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdSB</i> (<i>r_B</i> ⁻ <i>m_B</i> ⁻), <i>gal</i> λ <i>dcm</i> (DE3), <i>rgU</i> ⁺ , <i>ileY</i> ⁺ , <i>leuW</i> ⁺
<u>XL-1blue</u>	E82	<i>supE44 hsd R17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac</i> F' <i>[proAB+ lacIq lacZDTn10 (Tet^r)]</i>

5.2.2 *C. pneumoniae* und *C. trachomatis*

<u>CWL029</u>	C1	Respiratorisches Isolat (ATCC-VR1013)
<u>L2 (LGV-2)</u>	C2	Lymphogranuloma venerum-Serovar (ATCC VR-902B)

5.2 Zelllinien

<u>HEp-2</u>	humane Epithelzellen (Larynx-Karzinom, ATCC-CCL23)
<u>THP-1</u>	humane Monozyten (ATCC TIB-202)

5.3 Plasmide

Name	Nr. (Stammsamml.)	Bemerkung	Hersteller/Referenz
pET43a	H3283	bakterieller Expressionsvektor	Novagen
pJM7	H2893	Vektor mit C-Terminus von AIDA	(Maurer <i>et al.</i> , 1999)
pASK-IBA2	H3355	regulierbarer Expressionsvektor	IBA GmbH, Göttingen

5.4 Oligonukleotide

Kürzel	Name	Verwendung	Sequenz (in 5'→3'-Richtung)*
P1	D5pET28	<i>N-pmpD</i> in pET43a (S17-T670)	<u>TTG</u> ATG CAT TCC GTA ATA GTA GCA ATA TTG TCA G
P2	D3'AA 670	wie P1	<u>CTG</u> CTA AGT TTT AGG AGG ATA ATG ATC TCC ATG
P3	5_NpmpDNde	<i>N-pmpD</i> (und <i>N + M-pmpD</i>) in pJM7 / pJM942	GGC CAT <u>CAT ATG</u> CAC ATG GAG CAC ATT CCT TAC TCT GCT CAG AAC
P4	3_NpmpDKpn	<i>N-pmpD</i> in pJM7 / pJM942	GGC CAT <u>GGT ACC</u> AGG AGG ATA ATG ATC TCC ATG ACT AC
P5	3_N+MKpn	<i>N + M-pmpD</i> in pJM7 / pJM942	GGC CAT <u>GGT ACC</u> CTC ATG TTA ATT TGA ACT CCG GCA G
P6	5_IBA2_blunt	<i>pmpD</i> mit der Signalsequ. von <i>ompA</i> in pASK-IBA2	GCA CAT TCC TTA CTC TGC TCA GAA C
P7	3_IBABam	wie P6	GAT CGC TAG AAA ATA ATA CGG ATA CCA CCA TTG

*Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Biotez, Berlin bezogen. Später verwendete Restriktionsstellen bzw. Überhänge für die Klonierung nach der Di-/Trinukleotid Methode sind unterstrichen.

5.5 Enzyme und Kits

Alkalische Phosphatase	Boehringer
DNA-Ligase	Gibco BRL
DNA-Polymerase <i>Expand long-template</i>	Roche
T ₄ -DNA-Polymerase (für Di-/Trinukleotid-Klonierung)	New Engl. Biolabs NEB
Gel-Extraktion, PCR-Purifikation, Plasmid-Midi-Kit	QIAGEN
IL-8 ELISA Kit	Biosource
Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I	usb, USA
Mycoplasmen-Detektionssystem	Roche
Proteinase K	Merck
<i>Protein-Assay</i>	BioRad
Restriktionsenzyme	NEB, Roche

RNaseA, Lysozym	Sigma
Trypsin (für limitierenden Verdau von EK)	Difco Lab., USA
Trypsin (Sequenzierqualität für MALDI-PMF)	Promega, Madison, USA
WST-1 Kit	Roche

5.6 Antikörper

soweit nicht Bestandteil von Kits (z.B. beim IL-8 ELISA Kit)

5.6.1 Primäre Antikörper

Zielmolekül	Lieferant	Spezies	Verdünnung	
			IF	WB*
Hsp60	Alexis Biochemicals (USA)	Maus	1:700	1:5 000
Hsp70	BioGenes (Germany)**	Maus	1:700	1:5 000
N-pmpD	BioGenes (Germany)**	Kaninchen	1:100	1: 400
Cpn (EK)	Milan Analytica AG (La Roche, CH)	Kaninchen	1:60	-
MOMP	Dako Ltd. (UK)	Maus	1:100	-
LPS	Progen GmbH (Germany)	Maus	1:50	-
MBP	SIGMA (m87)	Maus	-	1 : 4 000

*IF: Immunfluoreszenz, WB: Western- (Immun-) Blot

** nicht kommerziell, gegen rekombinantes Protein hergestellt

5.6.2 Sekundäre Antikörper

Zielspezies	Lieferant	Modifizierung	Verdünnung
Maus	Molecular Probes (NL)	Cy2 oder Cy3	1:150 (IF*)
Kaninchen	Molecular Probes (NL)	Cy2 oder Cy3	1:150 (IF*)
Maus	Amersham Biosciences (UK)	Peroxidase	1:5 000 (WB*)
Kaninchen	Amersham Biosciences (UK)	Peroxidase	1:5 000 (WB*)
Kaninchen	Jackson (USA)	12nm Gold	1:25 (Immun-EM)

*IF: Immunfluoreszenz, WB: Western- (= Immun-) Blot

5.7 Puffer und Lösungen

Angeführt sind nur selbst hergestellte Lösungen. Käufliche Puffer, z.B. Restriktionspuffer, wurden unverändert verwendet. Alle hitzestabilen Lösungen wurden 20min bei 121 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Hitzelabile Flüssigkeiten wurden sterilfiltriert. Lösungsmittel wurden nicht sterilisiert.

PBS 4,3 mM Na₂HPO₄
 1,47 mM KH₂PO₄
 137 mM NaCl
 2,7 mM KCl; pH auf 7,6 eingestellt

STETL-Lösung 50 mM Tris; pH 8,0
 8% Saccharose
 50 mM EDTA
 0,5% Triton X-100
 0,5 mg ml⁻¹ Lysozym

Puffer im Plasmid-Midi-Kit (QIAGEN):

P1-Puffer 10 mM EDTA
 50 mM Tris/HCl; pH 8,0
 100 mg ml⁻¹ RNase A (vor Gebrauch zugeben)

P2-Puffer 200 mM NaOH
 1% SDS

P3-Puffer 2,55 M Kaliumacetat; pH 4,8

QBT-Puffer 0,75 M NaCl
 50 mM MOPS
 15% Ethanol
 0,15% Triton X-100; pH auf 7,0 eingestellt

QC-Puffer 1 M NaCl
 50 mM MOPS
 15% Ethanol; pH auf 7,0 eingestellt

QF-Puffer 1,25 M NaCl

50 mM MOPS
15% Ethanol; pH auf 8,2 eingestellt

T(B)E-Puffer 10 mM Tris/HCl; pH 8,0
(89 mM Borsäure)
2 mM EDTA

Farbmarker für Agarosegele (*Gel Load*)

0,25% Bromphenolblau
0,25% Xylencyanol
30% Glycerin
1 mM EDTA

1D-Probenpuffer 50 mM Tris/HCl; pH 6,8
2 μ M EDTA; pH 8,0
1% SDS
125 mM β -ME
10% Glycerin
0,01% Bromphenolblau

10 x SDS-Elektrophoresepuffer:

1,92 M Glycin
250 mM Tris
1% SDS

2D-Puffer 25 mM Tris/HCl; pH 7,1
9 M Harnstoff
50 mM KCl
3 mM EDTA
70 mM DTT
100 nM Pepstatin, 1 mM PMSF
2% CHAPS
2% Carrier Ampholyte pH 2-4

1. Dimension 2-D	3,5% Acrylamid 0,3% Piperazin Diacrylamid 4% Carrier-Ampholytmischung (Klose und Kobalz, 1995)
Inkubationslsg.	125 mM Tris/Phosphat; pH 6,8 40% Glycerin 70 mM DTT 3% SDS
R₂₅₀-Färbelösung	0,25% Coomassie Blue R 250/L 45% Methanol 10% Essigsäure
Entfärbelösung	10% Methanol 7% Essigsäure
Blotting-Puffer	1,9 M Tris/HCl; pH 8,3 250 mM Glycin 20% Methanol
TBS(-T)	20 mM Tris/HCl; pH 7,6 0,8% NaCl (0,5% Tween 20)
RIPA Puffer	50 mM Tris/HCl; pH 7,4 1% Triton X-100 300 mM NaCl 5 mM EDTA

5.8 Medien und Zusätze

Wachstumsmedium für eukaryontische Zellen war RPMI 1640 (Gibco BRL).

Zusätze 300 mg ml⁻¹ L-Glutamin
10% FBS (hitzeinaktiviert)
25 mM HEPES

Zusätze Infektionsmedium 300 mg ml⁻¹ L-Glutamin
5% FBS (hitzeinaktiviert)
1 µg ml⁻¹ Cycloheximid

LB-Medium 10 g l⁻¹ Trypton (Caseinhydrolysat)
5 g l⁻¹ Hefeextrakt
5 g l⁻¹ NaCl
Zusatz für Festmedien: 15 g l⁻¹ Agar

5.9 Feinchemikalien

³⁵ S-Met/Cys (Promix; 14,3 mCi ml ⁻¹ = 530 MBq ml ⁻¹)	Amersham
Glasperlen, Latexkugeln (Polystyren, Ø 0,33 µm)	Sigma-Aldrich
CH, CNBr, DAM, Mowiol 40-88, Sepharose, Polymyxin B	Sigma-Aldrich
Microcon YM-10 Säulen	Millipore, USA
Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva
ECL Reagenz	Amersham und Perkin Elmer Life Sci., Inc.
FBS	Biochrome, Berlin
Ni-NTA Agarose	Qiagen
N-Lauryl-Sarkosin (Sarkosyl), Saponin, PFA	Sigma-Aldrich
Piperazin Diacrylamid	Bio-Rad, USA
SDS	Biomol
Servalyte	Serva, Heidelberg
STF [®]	Streck Lab., Inc., USA
Triton X-100	Calbiochem
Tween [®] 20 and -80	Merck

Urografin	Schering
Zwittergent® 3-14	Sigma-Aldrich
Agar, Caseinhydrolysat, Hefeextrakt	Gibco-BRL
Ammoniumperoxodisulfat	Pharmacia

Alle anderen Chemikalien wurden in den Reinheitsgraden „reinst“ oder „zur Analyse“ (p.a.) von den Firmen Merck, Roth, Sigma und Serva bezogen.

5.10 Geräte und Verbrauchsmaterial

Brutschränke	Heraeus und Thermo Life Sciences, Egelsbach
Chromatographiepapier 3MM	Whatman
Elektrophorese-Zubehör, Geltrockner Modell 58	BioRad
ELISA-Photometer	Molecular Devices, USA
Entwicklermaschine SRX-101	Konika
Epifluoreszenz-Mikroskop	Zeiss
Faltenfilter Ø 150 mm	Schleicher & Schuell
Filme (X-OMAT MR)	Kodak
Kühlzentrifuge RC 2B plus	Sorvall Du Pont
Laser-scanning Mikroskop (Kr-Ar Laser) TCS NT	Leica
MALDI Massenspektrometer (Voyager-Elite)	PerSeptive Biosys., USA
Microtiterplatten (Maxisorp)	Nunc
Mikroliter Tischzentrifuge, SpeedVac Konzentrator	Eppendorf
PCR-Thermostat	Perkin-Elmer
Photometer	Hach, Düsseldorf
Pipettenspitzen, Reagiergefäße 0,5 ; 1,5 und 2 ml	Sarstedt
Sonifizierer	Branson
Szintillationsflüssigkeit <i>Ready Protein+</i>	Beckman Coulter, USA
Tisch-Ultrazentrifuge Optima TLX	Beckman Coulter, USA
Transmissions-Elektronenmikroskop	Leo 906
Ultrazentrifuge (SW-40 Rotor)	Beckman
UV-Werkbank	MWG-Biotech

5.11 Computersoftware

Adobe Photoshop 6.0	Bildbearbeitung
AMPHI 6c	β -Poren-Vorhersagen
BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)	Homologiesuche
Grams PerSeptive 3.04	Massenspektrenauswert.
Matrix Sci. Ltd. Mascot 1.9 (http://www.matrixscience.com)	PMF-Datenbanksuche
Microsoft Word 97	Textverarbeitung
Microsoft Excel 97	Tabellenkalkulation
MS Screener 0.9.9	MALDI-Peptidevaluation
Multalin (http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/)	Sequenzalignment
Biorad PD Quest 7.1.0	2D-Gelanalyse
ProFound 4.10.5 (http://129.85.19.192/prowl-cgi/ProFound.exe?FORM=1)	PMF-Datenbanksuche
Sci Ed Central Clone Manager 5.1	Klonierungen