

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Kühl- und Tiefkühlschrank (-20°C)	Robert Bosch GmbH, Stuttgart
Zentrifugen:	
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf AG, Hamburg
Avanti J20	Beckman,
Avanti J25	Beckman,
Sigma 4K15C	Sigma, Deisenhofen
Elektroporator (Gene Pulser II)	BioRad Laboratories, München
Elektroporationsküvetten (Gene Pulser Cuvette, 0.2 cm)	BioRad Laboratories, München
Tiefkühlschrank, -80°C	Forma, ThermoQuest Analytische Systeme GmbH, Egelsbach
Gel-Dokumentation (Ethidiumbromid-Gele)	Herolab GmbH, Wiesloch
Inkubator BBD 6220	Heraeus Instruments Laboratory Products GmbH, USA
Schüttelinkubator 37°C	New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen
Schüttelinkubator Tritramax	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
PCR-Maschinen PTC100, 200, 225	MJ Research Inc., Watertown, USA
Power Supply	BioRad Laboratories, München
Q-Fill II-Maschine und Zubehör	Genetix, Christchurch, Dorset, GB
Maschine zum Einbündeln von Mikrotiter- plattenblöcken	Tippy Pack (binding machine), Spot, Manfred Pütz GmbH, Kerpen
Maschine zum Einschweißen von Mikrotiterplattenblöcken	Lady Pack (shrink wrap), Pactur Bologna, Italien
Wasserbad	Köttermann GmbH + CoKG, Uetze/ Härigen
Vakuumpumpe	Millipore, Schwalbach
Elektrophoresekammern	Eigenbau im Haus
Schüttler für Filter	Rocky, Fröbel Labortechnik, Wasserburg
Multiple Gel Caster für SDS Polyacrylamid Gele, Hoefer SE 215	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Vortex Genie 2-Mixer	Bender und Hobein AG Zürich, Switzerland
Photometer Ultrospec 3100 pro	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Blot-Apparatur, TransBlot SD transfer cell	BioRad Laboratories, München
Laserscanner für Filter: „ <i>luminescent image analyser</i> “; Modell LAS-1000 CH	Fujifilm, USA
Laserscanner für Slides/ ScanArray 4000	Packard Bioscience, Meriden CT, USA
Roboter für Picking und Spotting	entwickelt am MPI für molekulare Genetik
Spot-Roboter für Slides/ Q-Array	Genetix, Christchurch, Dorset, GB

BioRobot 8000 für Protein- und DNA-
Aufreinigung
Magnetrührer
Thermblock Digi-Block
Präzisionswaage PB1501
Schüttler waagrecht KS 250 *basic*
Roti für Blots RM5

Qiagen GmbH, Hilden
Stuart Scientific, GB
Vertrieb durch NeoLab, Heidelberg
Mettler Toledo, Schweiz
IKA Labortechnik GmbH + CoKG, Staufen
Ingenieurbüro CAT Zipperer GmbH, Staufen

2.1.2 Chemikalien und Enzyme

BenchMark Pre-Stained Protein Ladder
29% Acrylamid, 0.8% Bisacrylamid
Rotiphorese Gel 30
2 YT *Broth*
2 YT *Broth* Agar
Ammoniumpersulfat
Ampicillin
Attophos
Bovine Serum Albumin Fraction V
Coomassie brilliant blau R-250
 β -Mercatoethanol
D-+-Glukose monohydrate
DTT
Ethidiumbromid (10 mg/ ml)
Fötales Rinderserum, Hitze-inaktiviert
GeneRuler 1kb DNA *ladder ready-to-use*,
0,1 mg/ ml
Glycerin
Guanidinium Hydrochloride
Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
Kanamycin
Oligonukleotide
rainbow markers RPN756
Restriktionsenzyme

NiNTA-Agarose
Sigma Fast 5 Bromo-4-chloro-3-Indolyl
Phosphate/ Nitro Blue Tetrazolium Tablets
(BCIP/ NBT Alkaline Phosphatase Substrate)
Natrium Pyrophosphat
T4-DNA-Ligase

Taq DNA Polymerase
TEMED
Triton X-100
Trockenmilchpulver
Tryptone, Bacto
Tween 20
Harnstoff

Invitrogen
Carl Roth GmbH, Karlsruhe

BIO 101, Vista, CA, USA
BIO 101, Vista, CA, USA
BioRad Laboratories, München
Sigma, Deisenhofen
JBL Scientific, San Luis Obispo, USA
PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich
Pierce, Rockford Illinois USA
Sigma, Deisenhofen
Merck, Darmstadt
Serva, Heidelberg
Sigma, Deisenhofen
Gibco, Karlsruhe
MBI Fermentas, St.Leon-Rot

Merck, Darmstadt
Sigma, Deisenhofen
BioVectradcl PE Canada
Sigma, Deisenhofen
MWG-Biotech, Ebersberg
Amersham Life Science, Freiburg
New England Biolabs GmbH,
Schwalbach/Taunus
Qiagen GmbH, Hilden
Sigma, Deisenhofen

Sigma, Deisenhofen
New England Biolabs GmbH
Schwalbach/Taunus
Herstellung im Haus
Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Sigma, Deisenhofen
BioRad Laboratories, München
Difco Laboratories, Detroit, USA
Sigma, Deisenhofen
Merck, Darmstadt

Hefe-Extrakt	Difco Laboratories, Detroit, USA
Diethanolamine	Sigma, Deisenhofen
Glycin	Merk, Darmstadt
Tween 20	Sigma, Deisenhofen
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
EDTA	Merk, Darmstadt
Agarose	Gibco, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen

Anorganische Salze, Säuren, Basen und Alkohol waren *pro analysis* Qualität von Merck, Darmstadt. Alle Puffer, Lösungen und Nährmedien wurden mit doppelt destilliertem Wasser (Aqua dest.) angesetzt.

2.1.3 Antikörper

anti-Ziege-AP	Sigma, Deisenhofen
anti-Maus-AP	Sigma, Deisenhofen
anti-armenischer-Hamster-AP	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Vertrieb durch Dianova, Hamburg
anti-Human-IgG	Sigma, Deisenhofen
anti-Kaninchen-AP	Dako A/S, Dänemark
anti-Ratte-AP	Sigma, Deisenhofen
Ziege-anti-Maus-cy5	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Vertrieb durch Dianova, Hamburg
IFN- γ (Hamster-anti-Maus), 200 μ g/ ml	Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz CA, USA
IL-12-R (Kaninchen-anti-Maus) 200 μ g/ ml	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA, USA
MIP-1 β (Ratte-anti-Maus), 0,5 mg/ ml	PharMingen, San Diego, CA, USA
Anti-RGS His6, Maus monoclonal	Qiagen GmbH, Hilden

2.1.4 Oligonukleotide

pQE65: 5`-TGA GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG-3`; „Annealing“-Temperatur 65°C
 pQE276: 5`-GGC AAC CGA GCG TTC TGA AC-3`; „Annealing“-Temperatur 65°C

2.1.5 Kits

QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Plasmid Mini-, Midi-, Maxi Kit	Qiagen GmbH, Hilden

2.1.6 andere Materialien

3MM Blottingpapier	Whatman GmbH, Göttingen
Adhesive Sealing Sheets	ABgene, Hamburg
Agarplatten, 22.4 x 22.4 cm	Genetix, Christchurch, Dorset, GB
Deckgläschen, 24 x 60 mm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Fast Slides™	Schleicher und Schuell Bioscience, Dassel
Filterplatten, 96-well MADV N 65	Millipore GmbH, Eschborn
Kryoröhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Mehrkanal-Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Mikrotiterplatten, 384 well	Genetix, Christchurch, Dorset, GB
Mikrotiterplatten, 96 well	Greiner bio-one, Frickenhausen
Mikrotiterplatten, 96 deep-well	Qiagen GmbH, Hilden
Multiscreen-Filterplatten	Millipore GmbH, Eschborn
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Neenah, WI, USA
Petrischalen, Bio Assay Dish	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Pipetten (1000 µl, 200 µl, 20 µl, 10 µl, 2 µl)	Gilson, Frankreich, Vertrieb durch Abimed
Pipettier-Reservoir	Analysen Technik GmbH, Langenfeld
Plastik-Boxen	Costar, Wiesbaden
Klebefolie	Stewart Company, GB
PVDF-Membranen, 22.2 x 22.2 cm	Bio-Stat Diagnostics, Stockport, GB
Immobilon P	Millipore GmbH Eschborn
Reaktionsgefäße 50 ml, 15 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Reaktionsgefäße 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Replikatoren (384 pin)	Genetix, Christchurch, Dorset, GB
Saranfolie	Dow Chemical Company
Schlauchfolie	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Sterilfilter 0,2 µm	Sarstedt, Nürnberg
Faltenfilter Nr. 595	Schleicher und Schüll Bioscience, Dassel

2.1.7 Puffer und Medien

Attophos-Puffer

1 mM MgCl₂
100 mM Tris-HCl, pH 9,5

Attophos-Stammlösung

2,4 M Diethanolamin
5 mM Attophos
0,23 mM MgCl₂
pH 9,2 mit HCl einstellen

Blotpuffer

20 mM Tris-Cl, pH 8
20% (v/v) Methanol
150 mM Glycin

Puffer A

6 M Guanidinium-Hydrochlorid
0,1 M NaH₂PO₄
10 mM Tris
pH 8,0 mit HCl einstellen

Puffer C

8 M Harnstoff
0,1 M NaH₂PO₄
10 mM Tris
pH 6,3 mit HCl einstellen

Puffer E

Wie Puffer C
pH 4,5 mit HCl einstellen

Coomassie Brillant Blau-Färbelösung

1,25 g Coomassie Brillant Blau R 250 werden in 225 ml technischem Ethanol aufgelöst. 225 ml Aqua dest. und 50 ml Eisessig werden zugegeben. Die Lösung wird 2 h gerührt und dann durch einen Faltenfilter filtriert.

Denaturierungslösung

0,5 M NaOH
1,5 M NaCl

10x HMF-M-Gefriermix

4 mM MgSO₄
15 mM Na₃-Citrat
68 mM (NH₄)₂SO₄
36% Glycerin
0,13 M KH₂PO₄
0,27 M K₂HPO₄
pH 7,0, autoklaviert

40% (w/v) Glukose

400 g D⁺-Glukose Monohydrate werden in 1 l Aqua dest. gelöst und autoklaviert.

Neutralisierungslösung

1 M Tris-HCl, pH 7,4
1,5 M NaCl

1x PBS

137 mM NaCl
27 mM KCl
12 mM Na₂HPO₄
1,76 mM KH₂PO₄
pH 7,5

10x PCR-Puffer

0,5 M KCl
1% (v/v) Tween 20
15 mM MgCl₂
0,5 M Tris-HCl, pH 8,8
steril filtrieren durch einen Filter mit 0,2 µm Porengröße

SB-Medium

12 g/l Bacto-Trypton
24 g/l Hefe Extrakt
0,4% (v/v) Glycerin
17 mM KH₂PO₄
72 mM K₂HPO₄

Eine 20 x Kaliumphosphat-Lösung und eine 20/19 Lösung der verbleibenden Zusätze werden separat autoklaviert und in einem Verhältnis von 1:19 gemischt.

4 x SDS-Ladepuffer

0,2 M Tris-HCl pH 6,8
8% SDS
40% (w/v) Glycerin
0,4% Bromophenol blau
0,1 M DTT oder 20% β-Mercaptoethanol wurden separat zu den Proteinproben gegeben.

SOB

20 g/l Tryptone
5 g/l Hefe-Extrakt
10 mM NaCl
10 mM KCl
autoklaviert

SOC

20 g/l Tryptone
5 g/l Hefe-Extrakt
10 mM NaCl
10 mM KCl
10 mM MgCl₂
10 mM MgSO₄
20 mM Glukose
sterilfiltrierte 40%ige Glukose nach Autoklavieren hinzugeben

20x SSC

3 M NaCl
0,3 M Na₃-Citrat
pH 7,0

TBE-Puffer

90 mM Tris-Borat, pH 8,0
1 mM EDTA

TBS

10 mM Tris-HCl, pH 7,5
150 mM NaCl

TBSTT

20 mM Tris-HCl, pH 7,5
0,5 M NaCl
0,1% (v/v) Tween 20
0,5% (v/v) Triton X-100

Tris-Glycin-Laufpuffer (5x)

0,125 M Tris-Base
1,25 M Glycin
0,5% (w/v) SDS

2YT-Agar

46 g 2□YT-Broth-Agar-Gemisch (16 g Trypton, 10 g Hefe-Extrakt, 5 g NaCl, 15 g Agar) werden in 1 l Aqua dest. gelöst und durch Autoklavieren für 20 min bei 120°C sterilisiert.

2YT-Flüssigmedium

31 g 2□YT-Broth-Gemisch (16 g Trypton, 10 g Hefe-Extrakt, 5 g NaCl) werden in Aqua dest. gelöst und durch Autoklavieren für 20 min bei 120°C sterilisiert. Glukose und Antibiotika werden nach dem Autoklavieren zugegeben.

2.1.8 Seren

Die humanen Serumproben wurden von Frau Dr. Geraldine McCarthy, Mater Misericordiae Hospital, Dublin, Irland und von Frau Dr. Dorothee Hagemann, Berlin gesammelt.

Die murinen Serumproben wurden von Frau Tiina Humaljoki, Deutsches Rheumaforschungszentrum, gesammelt.

2.1.9 Stämme

SCS1, *E.coli* mit dem Hilfsplasmid pSE111 (entwickelt von Eberhard Scherzinger, Online unter <http://www.proteinstrukturfabrik.de/tp03page/vectors/pse111.pdf>)

2.1.10 cDNA

Die cDNA aus murinen T-Helferzellen Typ 1 (lang stimuliert) wurde von Bernd Korn, RZPD Heidelberg synthetisiert.

2.1.11 Plasmide

1. pQE30NAST

Für die Erstellung der cDNA-Expressions-Bibliothek wurde cDNA aus murinen TH1-Zellen in den *E. coli* Expressionsvektor pQE30NAST unter Verwendung der Schnittstellen SallI und NotI kloniert. Bei dem Vektor pQE30NAST handelt es sich um ein pQE30-Derivat (Qiagen). Dieser Vektor enthält zwei *lac-Operatoren* für eine durch IPTG induzierbare Proteinexpression. Durch die Präsenz der zwei *lac-Operatoren* erhöht sich die Effektivität der Bindung der *lacI-Repressoren*, so dass in Abwesenheit von dem Induktor IPTG die Repression des starken T5-Promotors sichergestellt wird. Des Weiteren befindet sich im Vektor die Sequenz für das RGSHis6-Epitop, so dass die Proteine als RGSHis6-Fusionsproteine exprimiert werden und über den Tag gereinigt werden können. Die multiple Klonierungsstelle („*multiple cloning site*“, MCS) des Vektors pQE30 wurde so modifiziert, dass eine gerichtete Klonierung über die Schnittstellen SallI/ NotI möglich ist (Büssow 1998).

2. pUC18 Stratagene, La Jolla, CA, USA

2.1.12 Proteinfiler der Expressionsbibliothek aus humanem fötalen Hirngewebe (hEX1)

Die humanen Seren wurden auf Proteinfilern einer cDNA-Expressionsbibliothek aus humanem fötalen Hirngewebe (hEX1 800, Plattennummern 505-603) hybridisiert. Diese Bibliothek wurde von Konrad Büssow (Büssow 1998) erstellt und enthält 37.830 Expressionklone. Die verwendeten Proteinfiler wurden vom RZPD Berlin bezogen. Die hEX1-Bibliothek wurde in einem 5 x 5 Pattern (vgl. Abb. 7) auf zwei 22,2 cm x 22,2 cm große PVDF-Membranen gespottet, die mit Set 8 (505-576) und Set 9 (577-603) bezeichnet sind.

2.1.13 Software

GenePixPro4.1, Axon instruments, Inc. Union City, Californien
Visual Grid®, Version 2.01 GPC Biotech AG, Martinsried
Visual Grid®, Version 3.4.1.921 GPC Biotech AG, Martinsried
Vector NTI 6; InforMax, Inc., Oxford, UK

2.1.14 Online Datenbanken DNA- und Protein-Analyse Tools

BLAST <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
Swiss-Prot <http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/swissfetch?>

2.2 Methoden

2.2.1 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Für Plasmidisolierungen wurden die Qiagen Mini-, Midi- und Maxi-Kits verwendet. Für die Vektorpräparation wurden die Bakterien in einem Volumen von 800 ml 2YT-Medium über Nacht bei 37°C angezogen. Die Aufreinigung des Plasmids erfolgte nach Vorschrift, wobei die DNA über vier Maxi-Säulen (je 200 ml) gegeben wurde. Je Säule wurde die DNA in 200 µl EB-Puffer oder Aqua dest. aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Für die Isolation der DNA aus 96 Klonen wurde der Biorobot 8000 (Qiagen) eingesetzt und die Klone hierfür in 96-well Mikrotiterplatten in je 1 ml Medium (2YT, 100 µg/ml Ampicillin, 15 mg/ml Kanamycin, 2% (w/v Glukose) angezogen. Die Aufreinigung erfolgte nach Protokoll des Roboters.

2.2.2 Restriktion

Es wurden 30 µg des Vektors pQE30NASt mit den Enzymen SalI (300 U), NotI (150 U) und BglII (70 U) nacheinander geschnitten. Für die Restriktion wurde die DNA mit SalI-Puffer, 1 x BSA und Aqua dest. zusammengegeben. Zunächst erfolgte die Restriktion mit SalI. Dabei wurde die Enzymmenge geteilt und zu verschiedenen Inkubationszeiten zugegeben. Nach Zugabe von einem Drittel der Menge des Enzyms SalI und Inkubation bei 37°C für drei Stunden wurde ein weiteres Drittel zugegeben und der Ansatz über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Zugabe des letzten Teils und eine Inkubation über 4 h. Dann folgte die Inkubation mit dem Enzym NotI, wobei die gleichen Schritte durchgeführt wurden. Um sicherzustellen, dass kein ungeschnittener Vektorrest verbleibt, wurde nach SalI und NotI noch mit BglII (70 U) über Nacht geschnitten. Diese einzelne Schnittstelle liegt zwischen den Schnittstellen für SalI und NotI. Nach der Restriktion wurde der geschnittene Vektor aus einem 0,8%igen Agarosegel mit Hilfe des Qiagen Kits QIAEX II eluiert.

2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Proben wurden horizontale Agarose-Gelelektrophoresen durchgeführt. Durch die negative Ladung der Nukleinsäuren ist eine Auftrennung im elektrischen Feld möglich. Im Agarose-Gel werden die DNA-Fragmente aufgrund ihrer Größe aufgetrennt, wobei die Geschwindigkeit der Fragmente umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe ist. Abhängig von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente variierte die Agarosekonzentration in den Gelen zwischen 0,8-2% (w/v) in 0,5% (v/v) TBE-Puffer (10 x TBE-Puffer: 0,9 mM Tris-HCL pH 8,0, 0,9 mM Borsäure, 20 mM EDTA). Um die DNA zu visualisieren, wurde den Gelen Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5 µg/ml zugefügt, welches sich in die DNA einlagert und durch Anregung mit UV-Licht leuchtet. Als Laufpuffer diente 0,5% (v/v) TBE. Vor dem Auftragen wurden die DNA-Proben mit 1 x Ladepuffer vermischt. Dieser Ladepuffer enthält Bromphenolblau zur Visualisierung der Lauffront bei etwa 400 bp sowie 15% (v/v) Ficoll, wodurch die Viskosität der Probe erhöht wird. Parallel zu den Proben wurden Marker-Lösungen mit DNA-Fragmenten bekannter Größe und Masse geladen. Es wurde eine Spannung von 80 V angelegt, und die Laufzeit betrug 20-30 min. Fotografiert wurden die Gele bei UV-Licht von 254 nm Wellenlänge.

2.2.3.1 Elution von DNA aus Agarose-Gelen

Für die Elution von DNA aus Agarosegelen wurde ein Gelelutionskit (Qiaex II) von Qiagen nach Vorschrift verwendet. Nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA wurden die gewünschten Fragmente unter langwelligem UV-Licht ($\lambda=366$ nm) mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten.

2.2.4 Ligation

Zur Verknüpfung von cDNA und Vektor-DNA über die Schnittstellen Sall und NotI wurde das Enzym T4-DNA-Ligase eingesetzt. Dieses katalysiert die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten freien 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppen linearer, doppelsträngiger DNA. 6 ng cDNA wurde in einem 10 µl Ligationsansatz mit 50 ng geschnittenem, aufgereinigtem Vektor und Aqua dest. vermischt und 45 s bei 70°C erhitzt. Auf Eis erfolgte dann die Zugabe von 1 x T4-DNA-Ligase-Puffer und 200 U T4-DNA-Ligase. Es wurde jeweils eine Religationskontrolle des Vektors zur Bestimmung des Vektorhintergrundes

mit angesetzt, bei der die Menge der Insert-DNA durch Aqua dest. ersetzt wurde. Die Ansätze wurden über Nacht bei 16°C inkubiert. Darauf folgend wurde die DNA mit 1/ 10 Volumen 3 M Natriumacetat und 3 Volumen eiskaltem 100%igem Ethanol für 20 min bei –80°C gefällt. Nach 30-minütiger Zentrifugation wurde das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 10 µl Aqua dest. aufgenommen.

2.2.5 Transformation

2.2.5.1 Herstellung elektrokompenter *E. coli* Zellen

Es wurden 50 ml LB-Medium (mit 30 µg/ml Kanamycin) mit einer Kolonie *E. coli* des Stammes SCS-1 angeimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Für die Hauptkultur wurden 1,2 l SOB-Medium mit 1% (v/v) Vorkultur beimpft und bis OD₆₀₀= 0,4 - 0,5 bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die Kultur wurde dann 30 min auf Eis unter regelmäßigem Schütteln gekühlt und anschließend bei 5000 rpm (Beckman, JLA-16250) 15 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in je 200 ml eiskaltem 10%igen Glycerin resuspendiert. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 5000 rpm (Beckman, JLA-16250). Die Pellets wurden mit je 100 ml eiskaltem 10%igen (v/v) Glycerin gewaschen, wobei zwei resuspendierte Pellets vereinigt wurden. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 4°C, 5000 rpm (Beckman, JLA-16250) und Verwerfen des Überstandes erfolgte die Resuspendierung der Pellets in 2-5 ml eiskaltem Glycerin, Überführung in 50 ml Greiner-Röhrchen, Auffüllen mit Glycerin auf 50 ml und Zentrifugation bei 4°C und 4000 rpm (Sigma 11150/13350). Der Überstand wurde nun vorsichtig abgegossen, die Pellets in der zurückfließenden Flüssigkeit resuspendiert und in auf Trockeneis gekühlte 0,5 ml Eppendorfgefäße als 65 µl Aliquots überführt, die dann in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden. Die Lagerung erfolgte bei –80°C.

Zur Überprüfung der Kompetenz der Zellen wurde eine Transformation mit einem Kontrollplasmid (pUC18) in einer definierten Konzentration (1 pg/ Transformationsansatz) durchgeführt. Die Kompetenz sollte bei 10⁸-10¹⁰ KBE (Kolonie bildene Einheit)/ µg pUC 18 liegen.

2.2.5.2 Transformation durch Elektroporation

Für die Transformation wurden 30 µl auf Eis leicht angetaute elektrokompetente Zellen mit 5 µl gefälltem Ligationsansatz auf Eis vermischt und in eine gekühlte, sterile Elektroporationsküvette gegeben (gap 0,1 cm). Der elektrische Puls erfolgte bei 1,67 kV, 25 µF und 200 Ω. Anschließend folgte die Regeneration der Zellen in 1 ml ebenfalls gekühltem SOC-Medium bei 37°C im Schüttler für 1 h. Die Transformationsansätze wurden dann auf Selektivmedium (2YT, 100 mg/ml Ampicillin, 15 µg/ml Kanamycin, 2% (w/v) Glukose) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Für das Picking der Kolonien mittels eines Roboters sollte die Anzahl zwischen 1000 und 2000 Kolonien pro 23 cm x 23 cm Agarplatte liegen.

2.2.6 „Polymerase-Chain-Reaction“ (PCR) und DNA-Sequenzierung

Das Prinzip der PCR ist die enzymatische Vermehrung eines DNA-Abschnittes, welches durch Einsatz des aus dem thermophilen Bakterium (*Thermus aquaticus*) gewonnenen thermostabilen Enzyms *Taq-Polymerase* möglich wird. Während der PCR wird die DNA bei hohen Temperaturen denaturiert, spezifische Oligonukleotide werden bei bestimmter Temperatur hybridisiert und die Strangsynthese findet beim Temperaturoptimum der *Taq-Polymerase* statt.

In einen Standardreaktionsansatz von 50 µl werden 1 x PCR-Puffer, 0,2 mM dNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 4-200 ng Template, 0,2 µM Oligo 1, 0,2 µM Oligo 2, 2,5 u *Taq-Polymerase* und Aqua dest. gegeben.

Nach erstmaliger Denaturierung (4 min/ 94°C) wurden 24-30 Standardzyklen gefahren. Nach Beendigung der Synthese wurden die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt. Ein Standardzyklus setzte sich wie folgt zusammen:

1. Denaturierung 94°C/ 30 s
2. Hybridisierung 60°C/ 30 s
3. Strangsythese 72°C/ 1 min 20s

Die PCR-Produkte wurden auf 0,8-1%igen (w/v) Agarosegelen analysiert. Die Sequenzierungen erfolgten vom 5'-Ende mit dem Primer pQE65 und wurden von der Firma AGOWA GmbH

durchgeführt. Der Sequenzabgleich gegen bekannte Gene erfolgte über das BLAST-Programm (Altschul 1997).

2.2.7 Picking von Kolonien

Nach der Transformation der cDNA-Bank wurden die Klone mit Hilfe eines Picking-Roboters in mit Flüssigmedium (2YT, 100 µg/ ml Ampicillin, 15 mg/ ml Kanamycin, 2% (w/v) Glukose, 1 x HMFM-Gefriermix) gefüllte 384-well Mikrotiterplatten überführt. Der Roboter besitzt eine Auflösung von 5 µm, eine Schnelligkeit von 3 m/ s und ist in der Lage, 3600 Klone/ h zu picken. Der Roboterkopf, an dem eine CCD Kamera und ein herausnehmbares 96-Pin-Gadget angebracht sind, kann in X-, Y- und Z- Achse gesteuert werden. Das Gadget besteht aus einem Kunststoffblock, in dem die Pins aus Edelstahl einzeln hydraulisch bewegt werden können. Die Kamera teilt die Agarplatte (23 cm x 23 cm) in 54 Felder auf, um eine hohe Auflösung jedes einzelnen Bildes zu gewährleisten.

Nach Inkubation der Mikrotiterplatten wurden die Klone mit einem 384-Pin Replikator (Genetix) zweimal kopiert und bei -80°C gelagert.

2.2.8 Hochdichte Filter für Proteindetektion

2.2.8.1 Spotting auf Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membranen

Für die Herstellung von hochdichten Proteinfiltren der cDNA-Bank wurden die gepickten Klone mit Hilfe eines Roboters auf PVDF-Membranen gespottet. Der Roboter überträgt die Kulturen aus den Mikrotiterplatten mit einem 384-Pin-Gadget (Pin-Ø 0,4 mm, Pin-Abstand 4,5 mm) auf die Membran, wobei jede Platte auf zwei verschiedene Koordinaten gespottet wurde, so dass später jeder Klon durch zwei Spots identifiziert werden konnte. Dabei wurde jede Kultur zweimal auf ihre Position übertragen. Der Abstand zwischen den Spots betrug 1,4 mm. Das Spotting der Platten auf die Membran erfolgte in einem bestimmten Muster (5 x 5-Pattern, wobei ein „guide dot“ aus Tinte zentral in das Pattern gespottet wurde (vgl. Abb. 7). Der Filter wurde in 6 Felder eingeteilt, in die jeweils 12 Platten gespottet wurden. Auf diese Weise konnten die Klone in einer Dichte von 27.648 Spots auf einen 22,2 cm x 22,2 cm großen Filter übertragen werden.

Feld 2					Feld 6					Feld 3				
8	32	56	8	14	12	36	60	12	18	9	33	57	9	15
2	56	20	62	68	6	60	24	66	72	3	57	21	63	69
50	32	0	38	56	54	36	0	42	60	51	33	0	39	57
38	44	62	14	26	42	48	66	18	30	39	45	63	15	27
2	26	50	20	44	6	30	54	24	48	3	27	51	21	45
10	34	70	10	16	7	31	67	7	13	11	35	71	11	17
4	58	22	64	70	1	55	19	61	67	5	59	23	65	71
52	34	0	40	58	37	31	0	37	55	53	35	0	41	59
40	46	64	16	28	49	43	61	13	25	41	47	65	17	29
4	28	52	22	46	1	25	49	19	43	5	29	53	23	47
Feld 4					Feld 1					Feld 5				

Abb. 7: Anordnung der Mikrotiterplatten auf einem 22,2 cm x 22,2 cm großen ProteinfILTER.

Die Platten werden als Duplikate in einem 5 x 5-Pattern in sechs Feldern auf den Filter gespottet. So können 72 Platten angeordnet werden. In die zentrale Position (0) jedes Feldes wird ein Tintenpunkt gespottet, der bei der Auswertung als Bezugspunkt dient.

Die Membranen wurden zunächst mit 100% Ethanol aktiviert und danach mit Aqua dest. gewaschen. Danach liegen sie während des Spottens auf zwei mit 1 x PBS getränkten Whatman (3MM)-Filtern, um Austrocknung zu vermeiden. Die Filter werden nach dem Spotting auf 23 cm x 23 cm großen Agarplatten (2YT, 100 µg/ ml Ampicillin, 15 µg/ ml Kanamycin, 2 % (w/v) Glukose) plaziert.

2.2.8.2 Proteininduktion und Prozessieren der Filter

Die Kolonien wuchsen über Nacht bei 37°C bis zu einer Größe von ca. 1 mm Durchmesser. Daraufhin wurden die Filter auf Agarplatten mit Induktionsmedium (2YT, 100 µg/ ml Ampicillin, 15 mg/ ml Kanamycin, 1 mM IPTG) transferiert und für 4 h bei 37°C zur Proteinexpression inkubiert.

Die Filter wurden anschließend unter denaturierenden Bedingungen prozessiert. Für die Lyse der Kolonien wurden die Membranen auf getränktem Whatmanpapier bei Raumtemperatur mit folgenden Lösungen inkubiert: für 10 min mit Denaturierungslösung, zweimal 5 min mit Neutralisierungslösung und 15 min 2 x SSC. Dann wurden die ProteinfILTER bei Raumtemperatur getrocknet und gelagert.

2.2.9 Screening auf Proteinfiltren

Nach Aktivierung der getrockneten Proteinfiltren durch Behandlung mit 100% Ethanol und Aqua dest. wurden die Kolonien mit Hilfe von in TBSTT getränkten Zellstofftüchern vorsichtig abgewischt. Danach folgten Waschschrte, zweimal für 10 min mit TBSTT und einmal für 10 min mit TBS, wobei die Filter schüttelnd inkubiert wurden. Geblockt wurden die Filter mit 3% (w/v) Magermilchpulver in TBS (+ 0,1% (v/v) Tween20) für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Sowohl beim Screening mit Antikörpern als auch mit Seren erfolgten die Blocking- und Waschschrte schwenkend in Plastikboxen. Für die Inkubation mit Antikörpern und Seren wurden die Filter mit 10-20 ml der jeweiligen Lösung in Plastikfolie eingeschweißt und schwenkend inkubiert. Alle Inkubationsschrte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.2.9.1 Antikörperscreening

Die Antikörper wurden in Blockinglösung (3% (w/v) Magermilchpulver in TBS + 0,1% (v/v) Tween) verdünnt (anti-IL-12-R, anti-IFN- γ , anti-MIP-1 β : 1/ 1000, anti-RGSHIS6: 1/ 2000) und über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation folgten drei Waschschrte für 20-30 min mit TBS (+ 0,1% (v/v) Tween 20). Als sekundärer Antikörper wurde ein mit alkalischer Phosphatase konjugierter verwendet, der ebenfalls in 10-20 ml Blockinglösung verdünnt wurde (anti-Maus-AP: 1/ 5000; anti-Ratte-AP: 1/ 2500; anti-Kaninchen-AP: 1/ 2500; anti-Ziege-AP: 1/ 5000, anti-Hamster-AP: 1:2500). Nach zwei Waschschrten in TBST und einem in TBS wurden die Filter für 10 min in alkalischem Attophospuffer und dann für 5 min im Dunkeln mit Attophoslösung (0,125 mM in Attophospuffer) inkubiert. Dann konnten sie mittels einer CCD-Kamera unter UV-Bestrahlung mit 470 nm fotografiert werden.

2.2.9.2 Serumscreening

Für das Hybridisieren von Seren auf Proteinfiltren der hEX1 Bibliothek (2.1.12) wurden jeweils ein Filter von Set 8 und einer von Set 9 mit den Rückseiten aneinander zusammen mit Serumlösung (1/ 20 in 2% (w/v) BSA in TBS + 0,1% (v/v) Tween 20) eingeschweißt und über Nacht schwenkend inkubiert. Die Waschschrte erfolgten wie beim Antikörperscreening. Als zweiter Antikörper wurde ein anti-Human-IgG (Sigma) eingesetzt, der 1/ 5000 in 2% BSA verdünnt wurde. Nach drei weiteren Waschschrten wurde die Inkubation mit einem anti-mouse-Antikörper (Sigma, 1/ 5000 in 2% BSA in TBS + 0,1% (v/v) Tween 20), konjugiert mit

alkalischer Phosphatase, durchgeführt. Die folgenden Inkubationsschritte erfolgten wie beim Screening mit Antikörpern.

2.2.10 Auswertung der gescreenten Proteinfiler

Die Auswertung der Proteinfiler nach Hybridisierung mit Antikörpern oder Serum erfolgte mit der Software „Visual Grid“ (entwickelt im Haus). Hierbei wird ein Grid über den Filter gelegt, wobei die Ecktintenpunkte als Bezugspunkte dienen. In jedem Kästchen des Grids befinden sich beim 5 x 5 Pattern (vgl. Abb. 8) 25 Spots. Darunter sind zwölf verschiedene Klone in Duplikaten und ein zentraler Tintenpunkt. Um einen Klon als positiv zu werten, müssen in dem jeweiligen Feld zwei leuchtende Spots in einer durch das Pattern vorgegebenen Anordnung auftreten. Nach visueller Auswahl der positiven Klone durch den Benutzer wird mittels der Software eine Liste mit den Plattenkoordinaten erstellt.

2	6	12	2	3
1	10	4	11	12
9	6	•	7	10
7	8	11	3	5
1	5	9	4	8

Abb. 8: 5 x 5 Pattern mit Anordnung der Klone um den zentralen Tintenpunkt.

Die Zahlen stehen für die jeweiligen Mikrotiterplatten, wobei 12 Platten in Duplikaten um einen Punkt angeordnet sind.

2.2.11 Herstellung eines Expressionssubsets

Die Expressionsklone wurden auf PVDF-Membranen durch Hybridisierung eines gegen den RGSHis6-Tag gerichteten Antikörpers (anti-RGSHis6, Qiagen) detektiert. Zur Herstellung des Expressionssubsets wurden diese Klone mittels eines Roboters neu in 384-well Mikrotiterplatten, mit Gefriermedium (2YT+ 100 µg/ ml Ampicillin, 15 µg/ ml Kanamycin, 2% (w/v) Glukose, 1 x HMFM-Gefriermix) angeordnet. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden die Platten unter Zuhilfenahme von 384-Pin Replikatoren dreimal repliziert. Die Platten wurden auf Trockeneis eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.12 Proteinexpression und Aufreinigung in Mikrotiterplatten

Für die Proteinexpression in 96-well Mikrotiterplatten wurden die Klone in 200 µl Medium (2YT+ 100 µg/ml Ampicillin; 15 µg/ml Kanamycin; 2% (w/v) Glukose) angeimpft. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C im Schüttler wurden die Kulturen 1/10 in Induktionsmedium (SB+ 100 µg/ml Ampicillin, 15 µg/ml Kanamycin, 1 x KBP-Puffer, 20 µg/ml Thiamin) verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 - 0,6 schüttelnd bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 mM IPTG wurden die Kulturen weitere 4 h bei 37°C schüttelnd inkubiert, dann bei 4000 rpm (Sigma 09100/ 09158) 15 min bei 4°C zentrifugiert und bei -20°C bis zur Proteinaufreinigung gelagert.

Bei der denaturierenden Proteinaufreinigung in 96-well Mikrotiterplatten erfolgten alle Inkubationsschritte schüttelnd bei Raumtemperatur. Zunächst wurden die aufgetauten Pellets mit 150 µl Qiagen-Puffer A durch Vortexen resuspendiert und für die Lyse 30 min inkubiert. Nach 30-minütiger Zentrifugation 4000 rpm (Sigma 09100/ 09158) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und in Filterplatten überführt (Millipore Multiscreen MADVN6550). Der Durchfluss wurde daraufhin direkt in neue Filterplatten vakuumfiltriert. Zum Lysat wurden dann 30 µl einer 50%igen (v/w) NiNTA-Agaroselösung (in Puffer A verdünnt) zugegeben und eine Stunde inkubiert. Durch Filtration wurde die Flüssigkeit entfernt. Es folgten drei 5-minütige Waschschrte mit jeweils 100 µl Qiagen-Puffer C, bei denen die Flüssigkeit ebenfalls jedesmal durch Filtration entfernt wurde. Für die Elution wurden 60-100 µl Qiagen-Puffer D zugegeben und für 15 min inkubiert. Danach wurde das Eluat in eine Mikrotiterplatte filtriert.

2.2.13 SDS-Page

Für die Analyse der Proteine wurden SDS-Gelelektrophoresen durchgeführt, bei denen ein Protein-SDS-Komplex im elektrischen Feld wandert. Für die Elektrophorese wurde das diskontinuierliche Lämmli-System mit Tris-HCL-Puffern verwendet, bei dem ein Trenngel von einem Sammelgel überschichtet wird. Abhängig von der Größe der aufzutrennenden Proteine variierte die Polyacrylamidkonzentration in den Gelen zwischen 12,5-15 % (w/v). Die Gele bestanden aus folgenden Komponenten:

Trenngel	Sammelgel
0,1% (w/v) SDS	0,1% (w/v) SDS
12,5% (v/v) Acrylamid	4% (v/v) Acrylamid
0,38 M Tris-HCl, pH 8,8	0,125 M Tris-HCl, pH 6,8
0,1% (w/v) Amoniumpersulfat	0,1% (w/v) Amoniumpersulfat

Die Polymerisation des Trenngels wurde durch die Zugabe von 0,03% (v/v) und die des Sammelgels von 0,1% (v/v) Temed gestartet. Die Proteinproben wurden mit ¼ Volumen vom 4 x Ladepuffer (0,2 M Tris-HCl pH 6,8, 8% (w/v) SDS, 40% (w/v) Glycerin, 0,4% (w/v) Bromophenolblau) vermischt. Zur Reduktion wurde separat 0,1 M DTT oder 20% (v/v) β -Mercaptoethanol zu den Proben gegeben. Vor dem Auftragen auf das polymerisierte Gel wurden die Proben 5-10 min bei 100°C denaturiert. Als Laufpuffer wurde 1 x Tris-Glycin-Laufpuffer verwendet. Für die Elektrophorese wurde eine Spannung von 80 V angelegt, bis die Lauffront die Trenngelgrenze erreichte. Die Spannung wurde dann auf 120 V-180 V erhöht. Bei Erreichen der Lauffront an der unteren Gelgrenze wurde der Lauf gestoppt. Die Proteinbanden wurden durch Färbung mit Coomassie Brillant Blau Färbelösung für 30 min visualisiert. Entfärbt wurden die Gele mit 20% (v/v) Ethanol/ 10% (v/v) Eisessig.

2.2.14 Western-Blot

Für die Detektion von Proteinen mittels spezifischer Antikörper wurden die Proteine eines SDS-Gels mittels Western-Blot elektrophoretisch auf eine Membran übertragen. Verwendet wurden hydrophobe PVDF-Membranen und eine Blotapparatur für halbtrockene Western-Blots. Die für verwendeten Filterpapiere und die Membran wurden in Gelgröße zugeschnitten. Auf drei Lagen in Blotpuffer getränktem Filterpapier lag die mit Ethanol und Wasser aktivierte und in Blotpuffer geschwenkte Membran. Auf die Membran wurde das Gel gelegt und auf das Gel wiederum drei Lagen getränkten Filterpapiers. Vor dem Anlegen des Stroms wurden Luftblasen entfernt. Die Menge des angelegten Stroms errechnete sich aus der Größe des Gels: $x \text{ mA} = \text{Gellänge} * \text{Gelbreite} * 0,8$.

Der Strom wurde für eine Stunde angelegt. Danach konnte der Blot getrocknet oder direkt mit Antikörpern hybridisiert werden.

Vor der Reaktion eines Blots mit Antikörpern wurden die restlichen Bindungsstellen durch Inkubation für 2h in einer Blockinglösung (2% (w/v) BSA in TBS + 0,1% (v/v) Tween 20 oder 3% (w/v) Milchpulver in TBS + 0,1% (v/v) Tween 20)) abgesättigt. Die Inkubation des ersten in Blockinglösung verdünnten Antikörpers (RGSHis6: 1/2000) erfolgte für 1 h. Nach drei Waschschritten mit TBS (+0,1% Tween) erfolgte die Inkubation mit dem zweiten markierten Antikörper, der ebenfalls in Blockinglösung verdünnt wurde (gleiche Verdünnungen wie in 2.2.9.1). Detektiert wurde mit BCIP/ NBT Alkalischer Phosphatase Substrat.

2.2.15 Proteinchips

2.2.15.1 Spotting von aufgereinigten Proteinen auf FASTTMslides

Für die Herstellung der Proteinchips wurden die Proteine denaturierend aufgereinigt. Jedes Protein wurde in drei Verdünnungsstufen (unverdünnt, 1:2 und 1:5; in Puffer A verdünnt) mit dem Roboter Qarray (Genetix) in Duplikaten auf Nitrocellulose beschichtete FASTTMslides (Schleicher & Schuell) gespottet. Dabei wurden die Proteine in einem 8 x 8 Pattern (vgl. Abb. 9) angeordnet. Es wurden zwei identische Felder auf jeden Chip gespottet.

32	28	24	20	16	12	8	4
32	28	24	20	16	12	8	4
31	27	23	19	15	11	7	3
31	27	23	19	15	11	7	3
30	26	22	18	14	10	6	2
30	26	22	18	14	10	6	2
29	25	21	17	13	9	5	1
29	25	21	17	13	9	5	1

Abb. 9: 8x8 Pattern, das zum Spotting der Proteine auf Glaschips verwendet wurde.

Durch die Verwendung dieses Pattern ist es möglich mit 16 Pins 1024 Klone zu spotten.

2.2.15.2 Screening von Antikörpern und Seren

Vor der Hybridisierung von Seren und Antikörpern wurden die Slides nach dem Spotting für 2h mit 3% (w/v) Milchpulver in TBS + 0,1% (v/v) Tween 20 bei Raumtemperatur schüttelnd blockiert. Für die Inkubation mit Seren und Antikörpern wurden die Slides auf feuchte Tücher gelegt. Sowohl Seren als auch Antikörper wurden in Blockinglösung (3% (w/v) Milchpulver in TBS + 0,1% (v/v) Tween 20) verdünnt eingesetzt. Die Seren wurden 1:20 und der Antikörper

gegen den RGSHis6-Tag 1:800 verdünnt je 200 µl pro Chip auf die Oberfläche pipettiert und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Nach Inkubation bei 4°C über Nacht folgten drei Waschschrte für 20 min mit 3% Milchpulver/ TBST (0,1% (w/v) Tween 20). Die folgenden Inkubationen der Antikörper erfolgten bei Raumtemperatur jeweils für 1 h. Als zweiter Antikörper wurde ein anti-Human-IgG (Sigma) 1/ 5000 verdünnt eingesetzt. Nach drei weiteren Waschschrten mit TBST (0,1% (v/v) Tween 20) für jeweils 20 min wurde die Inkubation mit einem anti-Maus (1/ 800 verdünnt) konjugiert mit Cy5 durchgeführt. Sowohl dieser als auch alle folgenden Inkubationsschrte wurden im Dunkeln durchgeführt. Nach drei weiteren Waschschrten mit TBST (0,1% (v/v) Tween 20) für jeweils 20 min folgten zwei 15-minütige Waschschrte mit 1 x PBS (0,1% (v/v) Tween 20) und zweimaliges kurzes Abspülen mit Aqua bidest. Daraufhin wurden die Slides getrocknet und mit einem Laserscanner (Packard Bioscience) bei 649 nm eingescannt.

Die Auswertung der Spots erfolgte mit dem Programm GenePix Pro 4.1 (Axon Laboratories), welches die Möglichkeit bietet, die Signalstärke der Spots zu bestimmen.