

6 Methoden

6.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren

6.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA

6.1.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA nach Holmes und Quigley (Boiling-Prep)

1,5 ml einer ü/n-Kultur wurden 3min bei 20 000 x g abzentrifugiert und das Zellpellet in 110 µl STETL-Lösung resuspendiert. Nach Inkubation für 20min auf Eis folgte der Aufschluss der Zellen für 30sec in kochendem Wasserbad. Die Zelltrümmer wurden 15min bei 20 000 x g pelletiert und der Überstand durch Zugabe von 110 µl Isopropanol und Zentrifugation bei 20 000 x g 4°C 30min gefällt. Das DNA-Pellet wurde mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 25 µl TE-Puffer resuspendiert. Von dieser Lösung waren 5 µl ausreichend für einen Verdau mit Restriktionsenzymen und eine anschließende gelelektrophoretische Analyse.

6.1.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA im mittleren Maßstab (Midi-Prep)

50 ml einer ü/n-Kultur wurde bei 3 600 x g und 4°C 20min pelletiert, in 4 ml P1-Puffer gründlich resuspendiert und durch Zugabe von 4 ml P2-Puffer 5min bei RT lysiert. Nach Zugabe von 4 ml P3-Puffer und Inkubation auf Eis für 20min wurde 30min bei 3 600 x g zentrifugiert und das Lysat über einen Faltenfilter auf eine zuvor mit 4 ml QBT-Puffer äquilibrierte Qiagen-100-Säule appliziert. Es folgten zwei Waschschrte mit je 10 ml QC-Puffer, Elution mit 5 ml QF-Puffer und Fällung der DNA im Eluat durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol sowie Zentrifugation für 45min bei 4°C und 14 500 x g. Anschließend wurde das DNA-Pellet mit 5 ml eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und getrocknet. Die Konzentration der in 50 ml TE-Puffer resuspendierten DNA lag bei 1-2 mg ml⁻¹ und der Quotient A_{260}/A_{280} zwischen 1,5 und 2,0.

6.1.2 PCR

Der PCR-Reaktionsansatz für Klonierungen bestand aus:

5 µl	10 x Reaktions-Puffer 3 (mit 22,5 mM MgCl ₂)
je 2,5 µl	dNTPs
je 1 µl	Primer (50 pmol ml ⁻¹)
0,75 µl	<i>Long-range</i> DNA-Polymerase
1 µl	DNA-Matrize (aufgekochte EK-Stammsuspension)
ad 50 µl	H ₂ O

Das Reaktionsprofil war:

10min	94 °C
25 Zyklen aus	10sec 94 °C / 0,5min T _A * / 0,8min pro 1000 bp 68 °C
10min	68 °C
∞	4 °C.

*T_A: Hybridisierungstemperatur = 10°C unter der berechneten Schmelztemperatur der Primer (= G/C x 4 + T/A x 2)

6.1.3 Gelelektrophorese

Die Agarose wurde in Konzentrationen von 0,6 % bis 2 % in TBE-Puffer suspendiert, im Mikrowellenherd zur vollständigen Quellung gebracht und nach Zusatz von 2ml Ethidiumbromid auf 50 ml Gellösung in vorbereitete Flachbettapparaturen gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 1/6 Volumen Farbmaler in die Taschen der erstarrten und mit TBE überschichteten Gele pipettiert und mit einer Spannung von maximal 6 V cm⁻¹ Elektrodenabstand elektrophoretisch aufgetrennt.

Als Größenstandard dienten in kb: 10; 8; 6; 5; 4; 3,5; 3; 2,5; 2; 1,5; 1; 0,75; 0,5; 0,25 (MBI Fermentas). Auf einer UV-Durchlichtbank wurden die DNA-Fragmente sichtbar gemacht und dokumentiert.

6.1.4 Enzymatische Modifizierung und Klonierung von DNA-Fragmenten

6.1.4.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen und Ligation

Die Plasmide und PCR Fragmente wurden mit 3 µl 10x Reaktionspuffer und der entsprechenden *Units* des Restriktionsenzym (doppelte berechnete Menge) mit H₂O auf ein Volumen von 30 µl aufgefüllt und 4 h bei 37 °C inkubiert.

Die Reinigung erfolgte mit dem *PCR-Purification*-Kit.

Die Ligationen wurden mit der T₄-DNA Ligase für 4 h bei RT oder ü/n bei 4 °C durchgeführt. Hierzu wurden folgende Komponenten in einem Reaktionsgefäß gemischt (Verhältnis Vektor:Insert = 1:4):

5 µl	5 x Ligation Buffer
x µl	Vektor-DNA
x µl	Insert-DNA
1 µl	T ₄ -DNA-Ligase (2U)
ad 14 µl mit H ₂ O	

6.1.4.2 Klonierung mit der Di-/Trinukleotid Methode

Vorteil dieser Methode ist die passgenaue Klonierung von PCR-Fragmenten unabhängig von vorhandenen Restriktionsschnittstellen in der amplifizierten Sequenz. Die Enden des PCR-Produkts (2,5-5 µg) wurden dazu in 40 µl Gesamtvolumen mit 4 µl 10x-Puffer; 0,4 µl BSA (10 mg/ml); 2U T₄-DNA Polymerase und einem Überschuss (4 µl der 10mM Stammlösungen) der Nukleotide inkubiert, die am 3'-

Ende dem gewünschten, überstehenden Ende folgen. In der Trimming-Reaktion entfernt die Polymerase mit ihrer *proof-reading* Funktion bei 12°C in 30min vom 3'-Strang so viele Nukleotide, bis das im Überschuss vorhandene zum Stop des Abbaus führt.

Der Vektor (7 µg) wird an der gewünschten Stelle mit einer Restriktionsendonuklease wie in 6.1.4.1 geschnitten und die überstehenden Enden durch Zugabe von 4U Klenow Enzym und den gewünschten Nukleotiden (4 µl der 10 mM Stammlösungen) in 30min bei RT nur soweit aufgefüllt, dass die verbleibenden Überhänge mit denen des PCR-Fragment komplementär sind.

Vor der Ligation wie in Abschnitt 6.1.4.1 wurde die DNA entweder über eine Gelelektrophorese und das Gel-Extraktions-Kit oder eine Ethanolfällung gereinigt.

6.1.5 Fällung von DNA

Die DNA-Lösung wurde mit Wasser auf ein Volumen von 90 ml gebracht und mit 10 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,8) versetzt. Durch Schütteln mit 100 µl Phenol/Chlorophorm/Isoamylalkohol (25:24:1) gefolgt von einer 3minütigen Zentrifugation bei 20 000 x g zur Phasentrennung wurde die DNA-Lösung deproteiniert. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen, in einem neuen Reaktionsgefäß erneut mit 100 µl Phenol/Chlorophorm/Isoamylalkohol extrahiert und zentrifugiert. Schließlich wurde die DNA-haltige Oberphase mit 250 µl Ethanol versetzt und nach 5minütigem Abkühlen bei -20°C mindestens 30min durch Zentrifugation bei 20 000 x g und 4°C gefällt. Das Na⁺-DNA-Präzipitat wurde mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen, durch Zentrifugation pelletiert, getrocknet und mit TE-Puffer in Lösung gebracht.

6.1.6 Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation

Mit 1 ml einer ü/n-Kultur des gewünschten *E. coli*-Stamms wurden 50 ml frisch angesetztem LB-Medium in einem Erlenmeyerkolben inokuliert und bis zu einer OD₅₇₈ von 0,6-0,7 bei 37°C geschüttelt (ca. 3h). Die Zellen wurden anschließend bei 3 600 g und 4°C 10min abzentrifugiert und das Bakterienpellet in 20 ml eiskalter 100 mM MgCl₂-Lösung resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 7,5 ml 100 mM CaCl₂ resuspendiert und 30min auf Eis gestellt. Nach Zentrifugation

und Zugabe von 2 ml 100 mM CaCl₂ schloss sich eine Inkubation der Suspension für 1-2 h auf Eis an. Nach Zugabe von 1,5 ml Glycerin wurden die kompetenten Zellen á 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zum Gebrauch gelagert bzw. direkt zur Transformation eingesetzt.

Zur Transformation wurde Plasmid-DNA (20-200 ng) mit den Zellen 30min in Eis gestellt und nachfolgend für 120sec in ein 42 °C-Wasserbad überführt. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium und Inkubation für 1 h bei 37 °C wurden die Bakterien 5min bei 2 600 x g abzentrifugiert und in verschiedenen Verdünnungen auf antibiotikahaltigen LB-Platten ausplattiert.

6.2 Arbeiten mit Proteinen

6.2.1 Eindimensionale Gelelektrophorese

Je 1 ml einer *E. coli*-Zellkultur oder 1x10⁶ HEp-2 Zellen wurden bei 2 600 x g bzw. 900 x g pelletiert und in 100 µl 1D-Probenpuffer resuspendiert. Nach Aufkochen bei 95 °C für 5min wurden die unlöslichen Zellbestandteile 5min bei 20 000 x g abzentrifugiert und gleiche Mengen des löslichen Proteinextrakts aufgetragen.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch Zugabe von 1ml der auf der Methode von Bradford basierenden *Protein-Assay*-Lösung von Bio Rad und Vergleich der Absorption bei 595 mit der einer BSA-Standardlösung nach 5min Inkubation.

Die Proteine wurden elektrophoretisch nach ihrem apparenten Molekulargewicht nach der Methode von Laemmli in diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen getrennt. Als Standard diente der *Bench MarkTM Prestained Protein Ladder* (Invitrogen) mit den Größenstandards (in kDa): 177; 114; 81; 64; 50; 37; 26; 20; 15 und 8 bzw. 185; 121; 86; 69; 53; 40; 28; 22; 17 und 9.

Als Sammelgel wurde die polymerisierte Lösung aus 250 µl 1,5 M Tris/HCl (pH 6,8); 333 µl einer 30%igen Acrylamid-Bisacrylamidlösung (19:1); 1,85 ml H₂O; 20 µl 10% SDS; 3 µl TEMED und 20 µl APS verwendet. Die Trenngele wurden durch Mischen von H₂O mit der 30%igen Acrylamid-Bisacrylamidlösung (19:1) zur gewünschten %igkeit in einem Volumen zu 2 ml pro Gel, die mit 1,85 ml 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8);

50 ml 10% SDS; 4 μ l TEMED und 40 μ l APS polymerisiert wurden. Zur Elektrophorese wurde ca. 1 h eine Spannung von 150-250 V bei 4 °C angelegt.

6.2.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Bakterien- oder Zellpellets wurden in 5-fachem Volumen des 2D-Puffers aufgenommen. Nach 30-60min Rühren und Vortexen bei RT wurden die Proben bei 100 000 x g 30min bei RT ultrazentrifugiert und der lösliche Überstand bei -70 °C gelagert. 60 μ g Proteine wurden bei analytischen, 250 μ g bei präparativen 2D-Gelen auf die anodische Seite der 1. Dimension aufgetragen und mit der Großgeltechnik getrennt (\varnothing 30 cm x 23 cm) (Klose und Kobalz, 1995). Die Gelstäbe der isoelektrischen Fokussierung (1. Dimension; 0,9 mm für analytische und 2,5 mm für präparative Gele) wurden 8 870 Vh fokussiert, 10min in Inkubationspuffer äquilibriert und bei -70 °C gelagert oder direkt auf die 2. Dimension bestehend 15% Acrylamid und 0,2% Bisacrylamid gelegt. Bei der SDS-PAGE nach dem System von Laemmli wurde das Sammelgel durch die vorinkubierte 1. Dimension ersetzt. Analytische Gele wurden 15min bei 65 mA und ca. 6 h bei 85mA, präparative Gele 15min bei 130 und ca. 6 h bei 160 mA getrennt (bis die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte).

6.2.3 Proteinfärbung

Analytische 2D-Gele wurden mit Silbernitrat gefärbt und 2 h bei 75 °C zwischen Zellophanmembranen getrocknet (Jungblut und Seifert, 1990). Präparative 2D-Gele sowie 1D-Gele (0,75 mm) wurden mit kolloidalem Coomassie Brilliant Blue G-250 gefärbt, in Wasser äquilibriert und in Plastikbeutel verschweißt gelagert (Doherty *et al.*, 1998). 1D-Gele wurden in R₂₅₀-Färbelösung 1 h ge- und 2 x 1 h in Entfärbelösung entfärbt.

6.2.4 Enzymatischer Verdau

6.2.4.1 Verdau von chlamydialen EK mit Trypsin

Zur Ermittlung der Oberflächenlokalisierung von N-pmpD wurden EK (1×10^7 IFU) mit 0; 0,5; 2; 10; 50 und 200 μ g ml⁻¹ Trypsin für 30min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von PMSF (2mM EK) wurden die intakten EK durch Zentrifugation bei 20 000 x g

30min. pelletiert und die Menge an N-pmpD nach SDS-PAGE im Immunblot quantifiziert.

6.2.4.2 Verdau von chlamydialen EK mit Proteinase K

Alternativ zum limitierenden Verdau mit Trypsin (6.2.4.1) wurden EK (1×10^7 IFU) mit aufsteigenden Konzentrationen an Proteinase K ($0,01$ - $1 \mu\text{g ml}^{-1}$) 10min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde wie in 6.2.4.1 mit PMSF gestoppt und N-pmpD im Immunblot quantifiziert.

6.2.4.3 Verdau von Proteinspots mit Trypsin

Die Proteine wurden direkt im Gel verdaut (Lamer und Jungblut, 2001). Dazu wurden die Coomassie G-250 gefärbten Spots mit einem Skalpell ausgeschnitten, zerkleinert und in $75 \mu\text{l}$ $200 \text{ mM NH}_4 \text{ HCO}_3$ (pH 7,8) 30min bei 30°C inkubiert. Die Gelstücke wurden durch Zusatz von $105 \mu\text{l}$ Acetonitril für 30min dehydriert und nach Wiederholung der beiden Schritte in $50 \text{ mM NH}_4 \text{ HCO}_3$ (pH 7,8) inkubiert. Nach Trocknen unter Vakuum wurde je $0,1 \mu\text{g}$ Trypsin gelöst in $1 \mu\text{l}$ 50 mM Essigsäure und $19 \mu\text{l}$ NH_4HCO_3 zugegeben und bei 37°C ü/n inkubiert. Die Trypsin-Peptidmischung wurde abgenommen, die Gelstücke in $25 \mu\text{l}$ $0,25\%$ wässrige TFA/Acetonitril (1/1) geschrumpft und der Überstand erneut abgenommen. Die vereinigten Überstände wurden eingeeengt und in $1 \mu\text{l}$ $0,5\%$ wässrige TFA/Acetonitril (2/1) gelöst.

6.2.5 Proteinidentifizierung über die Massenspektrometrie

6.2.5.1 MALDI und PMF

Die in TFA/Acetonitril (2/1) gelösten Peptide (6.2.4.3) wurden mit gleichem Volumen Matrix (20 mg ml^{-1} α -Cyano-4-Hydroxi-Zimtsäure oder 50 mg ml^{-1} 2,5-Dihydroxi-Benzoessäure) gelöst in $0,3\%$ wässrigem TFA/Acetonitril (2/1) vermischt und auf eine goldbeschichtete Probenplatte aufgetragen. Nach Ko-Kristallisation wurden die Proben im Reflektron-Modus eines *time of flight*-MALDI-Massenspektrometers vermessen und die Spektren durch Summierung der Ergebnisse von 200-250 Laserpulsen generiert (Beschleunigungsspannung 20 kV ; 70% Gitterspannung; $0,05$ Leitbahnspannung; 100ns Verzögerungszeit; Massenaufzeichnung ab 500 m z^{-1}).

Die Proteine wurden durch Vergleich der gemessenen Massen mit den theoretisch durch Verdau mit Trypsin zu generierenden Peptidmassen aller vorhergesagter Proteine identifiziert. Als Suchprogramme für diesen Peptid-Fingerabdruck (PFM) wurden *ProFound* (<http://129.85.19.192/prowl-cgi/ProFound.exe?FORM=1>) und in erster Linie *Mascot* (<http://www.matrixscience.com/cgi/index.pl?page=../home.html>) verwendet. Als Datengrundlage diente eine in *Mascot* selbstgenerierte Datenbank für *C. pneumoniae* CWL029 sowie die NCBI-nr Datenbank für humane Proteine unter Einbeziehung maximal einer möglichen, nicht-geschnittenen Trypsin-Spaltstelle.

6.2.5.2 Peptidsequenzierung über ESI-MS/MS

Die Peptidgemische, die über den PMF keinem Protein zugeordnet werden konnten, wurden versandt und extern chromatographisch entsalzt (CapLC, Micromass, UK) sowie über ESI ionisiert und mit einem Quatrupol-*time of flight*-(Q-TOF)-Massenspektrometer (Micromass, UK) vermessen (Mattow *et al.*, 2003b).

6.2.6 Westerblot und Immundetektion

Direkt nach dem Elektrophoreselauf wurden die Proteine im Tank-Blot geblottet. Die PVDF-Membran wurde in Methanol aktiviert und 20min in Blot-Puffer äquilibriert.

Das Gel wurde blasenfrei auf die Membran gelegt und zwischen Blotting-Papier in die Blotapparatur gelegt. Bei 250 mA wurde 1 h oder bei 100 mA ü/n geblottet (>1mA pro cm² Blotfläche).

Die immunologische Detektion der membrangebundenen Proteine erfolgte durch Inkubation der Membran nach dem Blockieren in 4% Milchpulver (in TBS-T) mit dem ersten und danach zweiten, HRP-gekoppeltem Antikörper für je 1 h gefolgt von 3 Waschschritten mit TBS-T zu je 20min. Danach wurden die Membranen mit der Detektionslösung (Lösungen 1 und 2 im Verhältnis 1:1) überschichtet, in Folie gepackt und das Signal durch Auflegen eines Films aufgenommen.

6.2.7 Immunpräzipitation

Die HEP-2 Zellen (1×10^6) wurden vom Boden der Kulturplatte abgelöst, durch Zentrifugation (5min bei 960 x g) pelletiert und in nicht-denaturierendem RIPA Puffer lysiert. 1 µg Antikörper wurde ü/n bei 4°C mit dem Zelllysate inkubiert. Am nächsten Tag wurden 20 µl einer gesättigten Protein A-gekoppelten Sepharose zugegeben,

nach 3h drei mal mit jeweils 1 ml RIPA Puffer gewaschen (resuspendiert und je 1min bei 20 000 x g zentrifugiert). Schließlich wurde das Sepharosepellet in 30 µl 1D-Probenpuffer aufgenommen und vor der SDS-PAGE 5min bei 95°C hitzedenaturiert. Die Detektion erfolgte mit Coomassie R-250 und/oder Autoradiographie des getrockneten Gels.

6.2.8 Proteinexpression zur Herstellung polyklonaler Antikörper

N-pmpD (S17-T670, kloniert in pET43a mit einem His₆-Rest) wurde in *E. coli* BL21 durch Zugabe von 0,5M IPTG bei A₆₀₀ = 0,6-0,8 überexprimiert. Das lösliche, über eine Ni-NTA Affinitätschromatographie aufgereinigte Fusionsprotein wurde für die Interaktionsstudien mit THP-1 Zellen gegen PBS dialysiert, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Zur Herstellung der Antikörper wurde die unlösliche Fraktion in denaturierendem SDS-Puffer aufgenommen und über ein präparatives SDS-Gel getrennt. Die Banden wurden ausgeschnitten und zur Immunisierung der Kaninchen verwendet.

Die polyklonalen Antikörper wurden auf zwei Arten von Serumkomponenten gereinigt: Mit Protein A wurde mittels einer Affinitätschromatographie die Gesamt IgG-Fraktion isoliert, mit dem rekombinanten und an CNBr-aktivierte Sepharose 4B gekoppeltem N-pmpD alle Antikörper, die das native Protein erkennen.

6.2.9 ELISA

Die IL-8 Konzentration in THP-1 Zellkulturüberständen (siehe 6.3.3) wurde mit einem Sandwich-ELISA bestimmt. Dazu wurde ein monoklonaler Maus-anti-IL-8 Antikörper in 96-Loch Mikrotiterplatten ü/n bei 4°C adsorbiert. Ungebundene Flächen wurden mit 0,5% BSA geblockt. Die Überstände wurden danach 2 h bei RT in verschiedenen Verdünnungen in den Platten inkubiert. Nach drei-maligem Waschen wurde mit einem biotinylierten Maus-anti-IL-8 Antikörper 90min bei RT oder 30min bei 37°C inkubiert und nach abermaligem Waschen Peroxidase-konjugiertes Streptavidin zugegeben. Nach 30min Inkubation wurde die Farbreaktion mit frisch zubereitetem Tetramethyl-Benzidin gestartet und nach 20-40min bei 450 nm vermessen. Die Konzentrationen ergaben sich aus dem Vergleich mit parallel dazu behandelten Standard-IL-8 Mengen.

6.3 Arbeiten mit Zellkulturen

6.3.1 Kultivierung humaner Epithelzellen

HEp-2 Zellen wurden in Wachstumsmedium (Abschnitt 5.8) bei 37°C und 5% CO₂ in 75cm²-Zellkulturflaschen kultiviert und alle 3 Tage im subkonfluenten Stadium passagiert. Dazu wurden die Zellen mit sterilem PBS gewaschen und durch Zugabe von 1ml Trypsin/EDTA für 5-10min abgelöst. Die Zellsuspension wurde mit 5-fachem Volumen Wachstumsmedium zur Inaktivierung des Trypsins verdünnt und mit je 12 ml Medium auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

6.3.2 Kultivierung humaner Monozyten

THP-1 Zellen wurden alle 3 Tage 1:6 in Wachstumsmedium (Abschnitt 5.8) verdünnt und bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Zelldichte betrug dabei zwischen 1 und 5x10⁶ Zellen ml⁻¹.

6.3.3 WST-1 Test

THP-1 Zellen wurden durch Inkubation in Medium mit 0,2% FBS für 40 h in ihrem Zellzyklus synchronisiert, gewaschen und in Medium mit 10% FBS aufgenommen. Je 4x10⁴ Zellen in 200 µl Medium wurden in 96-Loch Platten mit verschiedenen Mengen unterschiedlich vorbehandelten rekombinanten N-pmpD versetzt: 2,5 und 25 µg ml⁻¹ rN-pmpD; rN-pmpD vorbehandelt mit 100 µg ml⁻¹ Polymyxin B (30min bei 37°C); α-N-pmpD Antiserum allein; α-N-pmpD-rN-pmpD Antigen-Antikörper-Komplexe; rN-pmpD verdaut mit Trypsin (200 µg ml⁻¹, 30min bei 37°C und inaktiviert mit 2 mM PMSF); hitzedenaturiertes rN-pmpD (10min bei 95°C); Trypsin/PMSF allein und 100 nM PMA als Positivkontrolle. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit 2% Triton X-100 lysiert. Nach Zentrifugation bei 920 x g für 1 h und Inkubation bei 35°C und 5% CO₂ für 24 h wurden die Überstände zur IL-8 Bestimmung (6.2.9) bis auf 40 µl abgenommen und 10 µl des Reagenz mit 40 µl Medium zugegeben. Nach Inkubation für max. 120min bei 37°C und 5% CO₂ wurde die Absorption bei 450 nm mit einem ELISA-Photometer gemessen. Wahrscheinlichkeitswerte von $p < 0,05$ (ermittelt nach dem *t-Test*) wurden als statistisch signifikant gewertet.

6.4 Arbeiten mit *C. pneumoniae*

6.4.1 Infektion von Epithelzellen mit *C. pneumoniae*

6.4.1.1 Aktive Infektion, Herstellung eines Bakterienstamms und Titerbestimmung

Die Infektion erfolgte in möglichst geringem Medienvolumen mit nur 5% statt 10% FBS und bei *C. pneumoniae* unterstützt durch Zentrifugation (1 h, 920 x g, 35 °C) (Al Younes *et al.*, 1999). Die HEp-2 Zellen wurden dazu ü/n auf Platten ausgesät (~80 % konfluent). Zur Herstellung von Bakterienstämmen wurden die infizierten Zellen 4 Tage (*C. pneumoniae*) bzw. 2 Tage (*C. trachomatis*) nach Infektion (p.i.) mit Glasperlen (3mm, Roth) geerntet und 4min. durch Vortexen aufgeschlossen. Nach Entfernen von Zelltrümmern und -kernen durch Zentrifugation (10min bei 500 x g) wurden die Bakterien im Überstand pelletiert (40min bei 48 000 x g und 4 °C) und in PBS-Puffer mit 0,25 M Saccharose (SPG) resuspendiert. Die partiell aufgereinigten Chlamydien wurden aliquotiert und nach 1-3h bei 4 °C in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert. Zur vollständigen Trennung von Zellorganellen, RK und EK für die Proteomanalyse wurden die Suspension in SPG Puffer vorher einer Dichtegradienten-Zentrifugation unterzogen (siehe 6.4.3).

Der infektiöse Titer der aliquotierten Stämme wurde durch serielle Verdünnung und Infektion von HEp-2 Zellen auf Deckgläschen in 24-Loch Platten bestimmt. Jede Inklusion, die nach Fixierung der infizierten Zellen 2 Tage p.i. und Färbung mit einem Antikörper unter dem Fluoreszenzmikroskop gezählt wird, ist theoretisch aus einem infektiösen EK hervorgegangen. Aus der Größe der Deckgläschen errechnet sich die Zahl der infektiösen Bakterien (EK) nach folgender Formel: $EK (IFU ml^{-1}) = [Inklusionen \text{ pro Mikroskop-Feld (x40)}] \times 2975,21 \times \text{Verdünnung} \times 2$.

Kontaminationen mit *Mycoplasma* spp. wurde durch PCR, DNA-Färbung und ein Mycoplasmen-Detektionssystem ausgeschlossen. Wo nicht anders vermerkt wurde bei Infektionen ein Titer von einem EK pro Wirtszelle (MOI = 1) eingesetzt.

6.4.1.2 Persistentes Infektionsmodell

Zur Induktion der Persistenz wurden 50 µM des Eisen-Chelators Deferoxamin-Mesylat (DAM) zum Zeitpunkt der Infektion ins Medium gegeben. Der Phänotyp der

persistenten Chlamydien ähnelte morphologisch denen mit IFN γ - oder Aminosäuremangel behandelten Infektionen und wurde auch bei Inkubation der Zellen mit DAM 1 h oder ü/n vor der Infektion erzielt (Al Younes *et al.*, 2001).

6.4.1.3 Neutralisierungsversuche

Verschiedene Volumina (10%, 50% und 90% eines Endvolumens von 50 oder 100 μ l) der gereinigten α -N-pmpD Antikörper (siehe 6.2.5, jeweils 5 mg ml $^{-1}$) wurden 1 h bei 37°C in PBS ohne Zusatz von Komplement inkubiert. Davon wurden in jeweils drei Verdünnungen Aliquots zur Infektion von HEp-2 Zellen genommen, welche ü/n in 24-Loch Platten ausgesäht worden waren. Nach Zentrifugation (1 h bei 920 x g und 35°C) wurden die Zellen weitere 2 Tage in Infektionsmedium mit 1 μ g ml $^{-1}$ CH inkubiert und der Titer wie in 6.4.1.1 beschrieben bestimmt.

Der Mittelwert der drei Verdünnungen (ca. 25, 50 und 100 Inklusionen pro x40-Mikroskopfeld) wurde mit dem der Kontrolle (EK 1 h inkubiert in PBS) verglichen, welcher auf 100% gesetzt wurde.

6.4.2 Metabolische Markierung

HEp-2 Zellen wurden zur vollständigen Infektion des Zellrasens in einer 6-Loch Platte mit einer MOI = 50 durch Zentrifugation infiziert und bei 37°C und 5% CO $_2$ kultiviert (6.4.1.1). Direkt nach der 1-stündigen Zentrifugation bzw. nach 24 h oder 48 h p.i. wurde das Infektionsmedium mit 20 μ g ml $^{-1}$ CH durch eines mit 200 μ g ml $^{-1}$ CH und ohne Methionin und Cystein aber mit 100 μ Ci ml $^{-1}$ [35 S]-Methionin/Cystein ersetzt. Nach weiterer Inkubation für 24 h wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen, mit einem Zellschaber von der Platte abgelöst und durch Zentrifugation bei 890 x g pelletiert. Bei „chase“-Experimenten wurde nach dem Waschen weiter in normalem Wachstumsmedium bis zum Ablösen der Zellen inkubiert. Nach Lyse des Zellpellets in 1D- oder 2D-Probenpuffer wurde die eingebaute Radioaktivität im Szintillationszähler nach Verdünnung 1:1000 mit Szintillationsflüssigkeit gemessen und 1x10 6 cpm auf die Gele aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die Gele 45min getrocknet und autoradiographisch detektiert (6 Tage bei 1x10 6 cpm).

6.4.3 Isolierung von RK und EK im Dichtegradienten

Zur Trennung der nur partiell aufgereinigten chlamydialen Formen (siehe 6.4.1.1) wurden die RK und EK in SPG-Puffer nach vollständiger Suspension mit Hilfe einer Einwegspritze (Nadeldurchmesser 0,6 mm) auf einen diskontinuierlichen Dichtegradienten aus 30, 35, 40 und 45% Urografin pipettiert und 1 h bei $50\,000 \times g$ ultrazentrifugiert. Während die meisten Wirtszellorganellen über der 30%-Schicht waren, befanden sich die EK an der Grenze zwischen der 40 und der 45%-Schicht, die RK an der zwischen der 35 und der 40%-Schicht. Die Fraktionen wurden mit einer Spritze abgenommen, in PBS und SPG-Puffer gewaschen und elektronenmikroskopisch auf ihre Reinheit untersucht.

6.4.4 Isolierung von OM- und COMC-Fractionen

Äußere Membranfraktionen (OM) wurden aufgrund ihrer Unlöslichkeit in 2% N-Lauryl-Sarkosin (Sarkosyl) isoliert, chlamydiale OM Komplexe (COMC) aufgrund ihrer Unlöslichkeit in 2% SDS unter nicht-reduzierenden Bedingungen (Caldwell *et al.*, 1981). EK-Stammsuspension (1×10^7 IFU in SPG) wurde dazu in 1 ml 2% Sarkosyl und 2% SDS in PBS mit oder ohne 10 mM DTT und 10% (2-ME) 60min bei 37°C inkubiert und die unlöslichen Fraktionen durch Zentrifugation bei $250\,000 \times g$ für 30min pelletiert und in 1D-Probenpuffer für die SDS-PAGE resuspendiert. Die verbliebene Menge an N-pmpD wurde im Immunblot ermittelt.

Die Interaktion von N-pmpD mit den EK wurde auch durch Inkubation der EK (1×10^7 IFU) für 20min bei 60°C in PBS oder für 60min bei 37°C in 200 mM KH_2CO_3 (pH 9,5), in 100 mM Glycin (pH 3,0), in 60 mM EDTA und 2 M NaCl, in 2% Zwittergent® 3-14 [= SB 3-14 = 3-(N,N-Dimethyl-Myristylammonio)-propansulfat], in 2% Tween20, in 2% Tween80, in 2% Triton X-100 oder in 2% Saponin mit anschließender Pelletierung der unlöslichen Fraktionen untersucht.

6.4.5 Native Immun-Färbung infizierter Zellen

Für die Immunfärbungen wurden HEp-2 Zellen in 24-Loch Platten auf Glasdeckgläschen ausgesät und am nächsten Tag durch Zentrifugation wie beschrieben infiziert.

6.4.5.1 Immunfluoreszenz

Für die konfokalen Analysen wurden die Zellen nach den angegebenen Zeiten p.i. mit PBS gewaschen und 30min mit 4% PFA bzw. STF[®] fixiert. Die Permeabilisierung erfolgte durch Inkubation in 0,5% Triton X-100 für 5min oder durch vorsichtiges Überschichten und Schwenken mit Glasperlen (\varnothing 425-600 μ M). Einer Blockierung mit 2% BSA in PBS für 20min folgten die 2 Färbeschritte mit primärem (in 2% BSA) und sekundärem (in PBS) Antikörper für jeweils 60min bei RT, nach denen jeweils 3x 5min mit PBS gewaschen wurde. Nach dem Trocknen wurden die Präparate in Mowiol auf Objektträger eingebettet und mit dem konfokalen Laser-scanning Mikroskop untersucht.

6.4.5.2 Elektronenmikroskopie

Für die immun-elektronenmikroskopischen Analysen wurden die Zellen mit 4% PFA/0,1% Glutaraldehyd fixiert, mit 1,6 M Saccharose/25% Polyvinylpyrrolidon versetzt, auf Aluminiumstumpfe befestigt und eingefroren. Ultradünne Kryoschnitte wurden mit Antikörpern inkubiert, gefolgt von Sekundärantikörpern gekoppelt an Goldkolloide, die unter dem Transmissions-Elektronenmikroskop sichtbar waren. Die EK- und RK-Präparationen wurden mit 2,5% Glutaraldehyd fixiert und Uranylacetat kontrastiert (Al Younes *et al.*, 2001).