

6. Methoden

6.1. Gewinnung von Parasitenmaterial

6.1.1. Gewinnung von *A. viteae*-Mikrofilarien und adulten *A. viteae*-Würmern

Meriones unguiculatus wurden mit Ketamin/Xylazin narkotisiert, über den retrobulbären Plexus ausgeblutet und durch Genickbruch getötet.

Die Mikrofilarien wurden über das Auswanderverfahren aus dem Blut infizierter *M. unguiculatus* gewonnen. Je 1 ml Blut wurde direkt in eine schräg aufgestellt Petrischale getropft, durch Zugabe von PHA-P-Lösung agglutiniert und mit je 5 ml inkomplettem RPMI überschichtet. Nach 3 Stunden wurde das RPMI abgenommen und die darin befindlichen Mikrofilarien durch Zentrifugieren geerntet. Überschichten und Ernten wurden wiederholt und die Mikrofilarien zum Schluß in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die überwiegend subkutan vorkommenden Filarien konnten beim Abpräparieren der Haut der getöteten Tiere isoliert werden. Auch in der Muskulatur und in der Brust- und Bauchhöhle liegende Würmer wurden bei der Sektion gewonnen. Um restliche Adulte auswandern zu lassen, wurden Haut und Körper der Tiere außerdem über Nacht in physiologische Kochsalzlösung (0,9%) gelegt.

6.1.2. Herstellung von *A. viteae*-Gesamtantigen

250 bis 300 weibliche Würmer wurden unter Zugabe von 1 ml PBS gründlich mit einer Schere zerkleinert. Danach wurden sie in einem Eis gekühlten Glashomogenisator 5 Minuten homogenisiert, 1 Minute bei 20% Pulslänge mit Ultraschall behandelt und 15 Minuten bei 4°C und $10.000 \times g$ zentrifugiert.

Der Überstand wurde abgenommen, steriltriiert, und weiterverwendet.

6.1.3. Herstellung von *C. elegans*-Gesamtantigen

Von einem Wurmpellet wurden 0,5 ml in 250 μ l PBS aufgenommen und im Glashomogenisator zerkleinert. Nachdem das Homogenat für 10 Sekunden bei 10% Pulslänge mit Ultraschall aufgeschlossen worden war, wurde es im Verhältnis 1:1 mit SDS-Probenpuffer gemischt.

6.1.4. Herstellung von *E. tenella*-Merozoiten-Gesamtantigen

Es wurden 1×10^7 Merozoiten in je 100 μ l PBS und SDS-Probenpuffer aufgenommen.

6.2. Molekularbiologische Methoden

6.2.1. RNA-Isolierung

Die Isolierung von RNA erfolgte mit dem RNeasy® Mini Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers.

Hierbei wurden jeweils <30 mg Gewebe eingesetzt, die mit Mörser und Pistill unter Verwendung von flüssigem Stickstoff, Lysispuffer und einer QIAshredder spin Säule homogenisiert wurden. Durch das Entfernen der Hydrathülle konnte die RNA dann an die Silikat-Gel-Membran binden, von der sie, nach mehrmaligem Waschen, mit RNase-freiem Wasser eluiert wurde.

6.2.2. Reverse Transkription

Zur Umschreibung von mRNA in complementary DNA wurde die Moloney murine leukemia virus (M-MLV-)Reverse Transkriptase (RT) verwendet.

Um Sekundärstrukturen innerhalb der RNA aufzubrechen, wurde sie für 5 Minuten auf 70°C erhitzt und anschließend sofort auf Eis gestellt. Ein Reaktionsansatz von 20 μ l bestand aus folgenden Anteilen:

RNA	1 μg
5 x Reaktionspuffer	5 μl
dNTP (10 mM)	1 μl
Oligo (dT) ₁₅ (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	1 μl
RT (200 U/ μl)	1 μl
Ribonuklease Inhibitor (40 U/ μl)	1 μl
dH ₂ O	ad 20 μl

Der Ansatz wurde für eine Stunde bei 42°C inkubiert. Zum Schluß wurde die RT durch fünfminütiges Erhitzen auf 70°C inaktiviert. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C.

6.2.3. PCR

Zur Amplifizierung der DNA wurde eine PCR mit thermostabiler DNA-Polymerase durchgeführt. Das PCR-Protokoll war wie folgt:

C. elegans

PCR-Ansatz:

Substanz	Menge
dNTP (10 mM)	2 μl
10 x PCR-Puffer	5 μl
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 μl
Primer forward (10 pmol/ μl)	2 μl
Primer reverse (10 pmol/ μl)	2 μl
Taq-Polymerase (5 U/ μl)	0,2 μl
Template-DNA	3 μl (12 μg)
dH ₂ O (steril)	ad 50 μl

Programmablauf:

Anzahl der Zyklen	1 x	30 x	1x
Denaturieren bei 94°C	1 min	1 min	
Annealing bei 50°C		1 min	
Synthese bei 72°C		1,5 min	3 min

A. viteae-cDNA

PCR-Ansatz:

Substanz	Menge
dNTP (10 mM)	1,25 μ l
10 x PCR-Puffer	5 μ l
MgCl ₂ (50 mM)	3 μ l
Primer forward (10 pmol/ μ l)	2 μ l
Primer reverse (10 pmol/ μ l)	2 μ l
Taq-Polymerase (5 U/ μ l)	0,2 μ l
Template-DNA	0,5 μ l (0,8 μ g)
dH ₂ O (steril)	ad 50 μ l

Programmablauf:

Anzahl der Zyklen	1 x	30 x	1x
Denaturieren bei 94°C	1 min	1 min	
Annealing bei 50°C		1 min	
Synthese bei 72°C		1,5 min	3 min

A. viteae-cDNA-Phagenbank

PCR-Ansatz:

Substanz	Menge
dNTP (10 mM)	1,25 μ l
10 x PCR-Puffer	5 μ l
MgCl ₂ (50 mM)	3 μ l
Primer forward (10 pmol/ μ l)	2 μ l
Primer reverse (10 pmol/ μ l)	2 μ l
Taq-Polymerase (5 U/ μ l)	0,2 μ l
Template-DNA	10 μ l (1 μ g)
dH ₂ O (steril)	ad 50 μ l

Programmablauf:

Anzahl der Zyklen	1 x	30 x	1x
Denaturieren bei 94°C	5 min	30 s	
Annealing bei 50°C		1 min	
Synthese bei 72°C		1,5 min	3 min

E. tenella-cDNA

PCR-Ansatz:

Substanz	Menge
dNTP (10 mM)	1,25 μ l
10 x PCR-Puffer	5 μ l
MgCl ₂ (50 mM)	3 μ l

Programmablauf:

Anzahl der Zyklen	1 x	30 x	1x
Denaturieren bei 94°C	5 min	1 min	
Annealing bei 50°C		1 min	
Synthese bei 72°C		1,5 min	7 min

Primer forward (10 pmol/ μ l)	2 μ l
Primer reverse (10 pmol/ μ l)	2 μ l
Taq-Polymerase (5 U/ μ l)	0,2 μ l
Template-DNA	1 μ l (1,5 μ g)
dH ₂ O (steril)	ad 50 μ l

Das Resultat der PCR wurde im Agarosegel (siehe 6.2.6.) ausgewertet.

6.2.4. RACE-PCR

Mit Hilfe der RACE-PCR wurden das 5'- und 3'-Ende eines *A. viteae*-cDNA-Fragmentes amplifiziert. Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers gearbeitet. Bei der RACE-RT-PCR wurden 2,5 μ l RNA (450 ng/ μ l) eingesetzt.

Der optimierte Programmablauf der RACE-PCR war folgendermaßen:

Anzahl der Zyklen	5 x		5 x		35 x	1 x
Denaturieren bei 94°C	30 s	94°C	30 s	94°C	30 s	
Annealing bei 72°C	2 min	70°C	30 s	68°C	30 s	
Synthese bei		72°C	2 min	72°C	2 min	10 min

Die Primerkombination bei der 5'-RACE-PCR bestand aus dem mit dem Kit gelieferten UPM-Primer und dem AvKlon1 Reverse-Primer 2, die Kombination der 3'-RACE-PCR aus dem AvKlon1 Forward-Primer 2 und dem UPM-Primer des Kits.

6.2.5. Inverse PCR

Zur Herstellung cDNA wurde eine PCR mit SL- und Oligo(dT)-Primern mit folgendem Programmablauf durchgeführt:

Anzahl der Zyklen	35 x	1 x
Denaturieren bei 94°C	1 min	
Annealing bei 50°C	2 min	
Synthese bei 72°C	5 min	5 min

Die doppelsträngige cDNA wurde nun mit 12 verschiedenen Restriktionsenzymen über Nacht bei 37°C verdaut, wobei pro Ansatz ein Enzym eingesetzt wurde. Nach der Aufreinigung mit dem NucleoSpin® Extraction Kit wurden je 30 µl der verdauten cDNA mit 1 µl T4-Ligase bei 4°C über Nacht inkubiert, so daß eine ringförmige doppelsträngige cDNA entstand. Diese wurde nachfolgend in der PCR (Programmablauf siehe 6.2.3.) eingesetzt.

6.2.6. Agarosegelelektrophorese

Die Beurteilung, Überprüfung und Aufreinigung von DNA wurde mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Entsprechend der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden 0,8 oder 1%ige Gele mit 0,004% Ethidiumbromid verwendet. Die Proben wurden mit 6 x Ladepuffer (Verhältnis 1:6) gemischt, bei 90 V aufgetrennt und schließlich unter UV-Licht sichtbar gemacht.

6.2.7. Isolierung von DNA-Fragmenten

Um DNA-Fragmente zu extrahieren, wurden sie entweder direkt aus der Probe oder nach der Isolierung aus dem Agarosegel mit Hilfe des NucleoSpin®- oder NucleoTrap®-Kits nach den Angaben im Protokoll aufgereinigt. Die Bindung der Nukleinsäuren erfolgte dabei an Silikatpartikel einer Membran bzw. Glasmilchsuspension.

6.2.8. Bestimmung von RNA- und DNA-Konzentrationen

In einer 1:50 Verdünnung wurden 2 µl der RNA-/DNA-Lösung im Spektralphotometer gegen einen Leerwert (dH₂O) bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Der Grad der Verdünnung wurde dabei ins Photometer eingegeben und bei der Konzentrationsangabe bereits berücksichtigt. Eine Einheit bei einer OD von 260 entspricht dabei 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml einzelsträngiger RNA.

6.2.9. Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten und Vektor

Um die DNA-Fragmente und den Expressionsvektor pET 28a(+) zu verdauen, wurden die entsprechenden Restriktionsenzyme und ihre Puffer den Herstellerangaben folgend eingesetzt und für 3 Stunden bei 37°C inkubiert.

Die Enzyme wurden dann durch direktes Aufreinigen des Reaktionsansatzes über das NucleoSpin® Extraction Kit oder durch Auftrennung im Agarosegel (siehe 6.2.7.) entfernt.

6.2.10. Dephosphorylierung von DNA

Durch das Abspalten der terminalen 5'-Phosphatgruppe von der MCS mit Hilfe der SAP sollte die Religation des geschnittenen Expressionsvektors pET 28a(+) vermieden werden. Es wurden 1-5 µg Plasmid nach den Angaben des Herstellers mit SAP und 10 x SAP-Puffer angesetzt und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Das dephosphorylierte Plasmid wurde im Anschluß mittels NucleoSpin® Extraction Kit aus dem Reaktionsansatz eluiert (siehe 6.2.7.).

6.2.11. Ligation in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy

Für die Ligation der PCR-Amplifikate in den T-overhang-Vektor pGEM-T Easy wurde folgender Ansatz für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert:

2 x Rapid Ligation Buffer	5 µl
pGEM-T Easy-Vektor	1 µl (= 50 ng)
PCR-Produkt	im Verhältnis 3:1 (PCR-Produkt:Vektor)
T4-DNA-Ligase	1 µl
dH ₂ O	ad 10 µl.

Positiv- und Vektorkontrolle wurden mitgeführt. Für die Positivkontrolle wurden 2 µl Control Insert DNA des Herstellers, für die Vektorkontrolle keinerlei Insert-DNA verwendet.

Zwecks Vermehrung des Vektors incl. Insert wurde er in *E. coli* JM 109 transformiert.

6.2.12. Ligation in den Expressionsvektor pET 28a(+)

Das geschnittene DNA-Insert wurde in den geschnittenen und dephosphorylierten Expressionsvektor unter Verwendung des Ansatzes von 6.2.9. ligiert. Die Inkubation erfolgte dabei bei 4°C über Nacht.

Zur Kontrolle wurde eine Ligation in geschnittenen und dephosphorylierten Vektor ohne Insert und eine Ligation von geschnittenem Insert in unverdauten und nicht dephosphorylierten Vektor vorgenommen.

6.2.13. Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Bakterien

Kompetente *E. coli* wurden nach dem Protokoll von Inoue et al. (1990) hergestellt. Dazu wurden 250 ml SOB-Medium mit einer Einzelkolonie des entsprechenden Bakterienstammes angeimpft. Bei 37°C und 220 rpm wurde die Kultur bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert, dann 10 Minuten auf Eis gestellt und bei 4°C zentrifugiert (2500 x g). Das Pellet wurde in 16 ml kalten TB-Puffer aufgenommen und erneut 10 Minuten auf Eis inkubiert und pelletiert. Nach der Resuspension in 4 ml kaltem TB-Puffer erfolgte unter Rühren die Zugabe von DMSO bis zu einer Endkonzentration von 7%. Bevor die Lösung aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert wurde, inkubierte sie 10 Minuten auf Eis. Die Transformationseffizienz lag bei 10⁷ transformierten Bakterienkolonien pro µg Plasmid-DNA.

6.2.14. Transformation kompetenter *E. coli*-Bakterien mit Plasmid-DNA

Für die Transformation wurden je 50 µl kompetenter Bakterien mit 5 µl des Ligationsansatzes oder 2 µl der Positiv- und Vektorkontrolle gemischt. Die Transformationsansätze wurden für 20 Minuten auf Eis, 45 Sekunden bei 42°C und für 3 Minuten abermals auf Eis inkubiert. Nachdem 900 µl SOC-Medium zugegeben worden waren, wurden die Bakterien bei 37°C für 1,5 Stunden bei 400 rpm inkubiert. Anschließend wurden 200 µl der Proben- und 100 µl der Kontrollansätze auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Neben den Ligationskontrollen wurde auch ein Ansatz ohne Plasmid mitgeführt.

6.2.15. Identifizierung positiver bakterieller Transformanten

6.2.15.1. Blau-Weiß-Screening

Hierzu werden Bakterien verwendet, die eine Mutation im lac Z-Gen haben. Deshalb bilden sie eine β -Galactosidase, der am N-Terminus 30 Aminosäuren fehlen und die somit enzymatisch inaktiv ist. Durch die Transformation dieser Bakterien mit einem Plasmid, das diese fehlenden Aminosäuren (α -Region) mittels IPTG induzierbar exprimiert, können sich die beiden Proteine zu einer funktionellen β -Galactosidase zusammenschließen, so daß das chromogene Substrat X-Gal umgesetzt wird und die entsprechende Bakterienkolonie blau färbt.

Durch die Ligation eines DNA-Inserts in die lac Z-Region des Plasmids kann keine α -Region mehr gebildet werden und es steht kein aktives Enzym mehr zur Verfügung. Die entsprechende Bakterienkolonie bleibt weiß.

Die LB-Platte wurden mit 60 μ l 2%iger X-Gal-Lösung und 2 μ l IPTG (1 M) präpariert.

6.2.15.2. Kolonie-PCR

Zur Überprüfung der Ligation des gewünschten Inserts bei den Transformanten wurden Bakterienklone in je 50 μ l destilliertes Wasser überführt, 5 Minuten auf 99°C erhitzt, pelletiert (1 Minute bei 12.000 rpm) und 10 μ l des Überstandes als Template in einer PCR eingesetzt. Reaktionsansatz und Programmablauf waren wie unter 6.2.3. beschrieben.

6.2.15.3. Plasmidpräparation und Restriktionsverdau

Der Erfolg der Transformation wurde kontrolliert, indem mit den entsprechenden Bakterienklonen eine LB-Flüssigkultur mit Antibiotikazusatz angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert wurde. Die Plasmid-DNA wurde mittels NucleoSpin®Plasmid Kit extrahiert (siehe 6.2.16.) und nach dem Restriktionsverdau (siehe 6.2.9.) im Agarosegel analysiert (siehe 6.2.6.).

6.2.16. Plasmidpräparation

Die Trennung der Plasmid-DNA von den übrigen Bakterienbestandteilen geschah mittels NucleoSpin®Plasmid Kit oder NucleoBond®Plasmid Midi Kit nach dem Herstellerprotokoll. Der alkalischen Lyse der Bakterien folgt dabei die Isolation der Plasmid-DNA durch Ionenaustauschchromatographie.

6.2.17. Plaque Screening

Für die Isolierung von *A. viteae*-cDNA aus einer *A. viteae*-Weibchen-cDNA-Bank mit dem Plaque Screening-Verfahren wurde mit dem „DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II“ gearbeitet. Das Protokoll des Herstellers diente dabei als Arbeitsvorlage.

6.2.17.1. DNA-Markierung mit Digoxigenin

Für die DIG-Markierung der DNA-Abschnitte wurde 1 μg DNA eingesetzt, das bei 95°C denaturiert und über Nacht bei 37°C mit DIG-High Prime-Lösung inkubiert wurde. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung gestoppt. Anschließend wurde die Ausbeute an DIG-markierter DNA (Sonde) überprüft, indem die Intensität des Signals der Probe mit der einer Verdünnungsreihe einer definierten DIG-markierten Kontroll-DNA des Herstellers auf Röntgenfilm verglichen wurde. Dabei ergab sich der maximale Wert von 2,3 μg .

6.2.17.2. Ausplattieren der Phagenbank

Die LB/MgSO₄-Platten wurden mindestens 20 Minuten bei 37°C vorgewärmt. Als Wirtsbakterien wurden XL1-Blue verwendet. Die Phagenbank enthielt 1,73 x 10⁹ pfu/ml. Um eine ausreichende Menge an cDNA zu prüfen, wurde beim ersten Screening eine vollständig lysierte Platte durch eine 1:100 Verdünnung der Bank erreicht, bei den Reklonierungen wurden einzelne, abgrenzbare Plaques durch eine 1:100 Verdünnung der Überstände (siehe 6.2.17.4.) erzielt. Die Phagenlösung wurde, je nach Plattengröße, mit der entsprechenden Menge an XL1-Blue für 15 Minuten bei 37°C inkubiert:

90 mm-Platten: 200 μ l XL1-Blue + 1 μ l Phagenlösung
140 mm-Platten: 500 μ l XL1-Blue + 3 μ l Phagenlösung.

Top-Agar wurde geschmolzen und auf 50°C abgekühlt. Dann wurden 5 ml (90 mm-Platte) bzw. 9 ml (140 mm-Platte) Top-Agar zum Ansatz dazugegeben, kurz gemischt und auf der vorgewärmten Platte gleichmäßig verteilt. Nach 10 Minuten bei Raumtemperatur war der Agar erstarrt und die Platte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert.

6.2.17.3. Transfer der Phagen-DNA auf Nylonmembran

Die über Nacht inkubierte Platte wurde für mindestens 1 Stunde bei 4°C abgekühlt. Auf die gekühlte Agarplatte wurde eine Nylonmembran luftblasenfrei für 3 Minuten aufgelegt, wobei die 140 mm-Membran zur besseren Handhabung vorher mit 2 x SSC angefeuchtet wurde. Die Lage der Membran auf der Platte wurde eindeutig markiert, z.B. durch das Einschmelzen von Löchern, bevor sie vorsichtig wieder von der Platte entfernt wurde.

Die Membran wurde dann für maximal 5 Minuten mit Denaturierungspuffer, Neutralisierungspuffer und für 10 Minuten mit 2 x SSC behandelt, bevor die DNA mit UV-Licht (254 nm für 25 Sekunden) auf der Membran fixiert wurde.

6.2.17.4. Hybridisierung mit DIG-markierter DNA und immunologische Detektion

Um eine gleichmäßige Behandlung der Membran zu erreichen, wurde sie für die folgenden Schritte in einer Glasröhre im Hybridisierungssofen inkubiert und gewaschen.

Vor der eigentlichen Hybridisierung mit der Sonde wurde die Nylonmembran 1 Stunde bei 42°C prähybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei ebenfalls 42°C, indem 25 ng Sonde/ml zur Prähybridisierungslösung gegeben wurden. Die Sonde wurde vorher durch Hitze denaturiert (5 Minuten bei 100°C).

Anschließend wurde die Membran zweimal mit 2 x SSC + 0,1% SDS für 5 Minuten bei Raumtemperatur und zweimal mit 0,5 x SSC + 0,1% SDS für 15 Minuten bei 65°C gewaschen.

Für die immunologische Detektion wurde die Membran in eine Petrischale überführt, 5 Minuten bei Raumtemperatur in Waschpuffer, 30 Minuten in Blockpuffer und weitere 30 Minuten in Anti-Digoxogenin-AP-Antikörperlösung geschwenkt.

Nach zweimaligem Waschen (15 Minuten bei Raumtemperatur) und Equilibrieren der Membran mit Detektionspuffer wurde das chemilumineszente AP-Substrat auf die Membran getropft. Durch Auflegen einer Plastikfolie konnte die Lösung gleichmäßig über die Membran verteilt werden.

Der Röntgenfilm wurde für ca. 20 Minuten aufgelegt und anschließend entwickelt.

Die Plaques, bei denen auf dem Film ein Signal sichtbar war, wurden großzügig ausgestochen und in 500 μl SM-Puffer überführt, damit die Phagen über Nacht bei 4°C auswandern und mit dem Überstand abgenommen werden konnten.

6.2.18. *In vivo*-Exzision

E. coli vom Stamm SOLR sollten mit den isolierten Phagemiden transformiert werden.

Dazu wurden zunächst 200 μl einer XL1-Blue-Flüssigkultur ($\text{OD}_{600} = 1$) mit 100 μl des Überstandes des isolierten Klonen und 2,5 μl Helferphagen für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 3 ml YT-Medium erfolgte eine zweistündige Inkubation bei 37°C im Schüttelinkubator. Hiernach wurden die XL1-Blue-Bakterien abgetötet (20 Minuten bei 70°C) und abzentrifugiert. Vom Überstand wurden 5 μl und 50 μl zu je 200 μl SOLR-Zellen ($\text{OD}_{600} = 1$) gegeben und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Je 100 μl dieser Kultur wurden auf Antibiotika-behandelten (Kanamycin und Ampicillin) Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert, um mit einem Einzelklon dieser transformierten und somit Kanamycin- und Ampicillin-resistenten SOLR-Bakterien weiterzuarbeiten.

6.2.19. Langzeitlagerung von Bakterien

Von einer Übernachtskultur des gewünschten Bakterienstammes werden 920 μl mit 80 μl Glycerin gemischt, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

6.2.20. Sequenzanalyse

Die Sequenzanalyse der Plasmide mit dem jeweiligen Insert wurde von der AGOWA GmbH, Berlin durchgeführt. Die Analyse der Proteinsequenzen von *Acanthocheilonema viteae* (siehe 3.2.) wurde von Sebastian Beck (RKI Berlin) durch Trypsinverdau und anschließende Massenspektrophotometrie (*probability based mowse score*) vorgenommen.

6.3. Biochemische Methoden

6.3.1. Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine

6.3.1.1. Induktion

LB-Medium mit Kanamycin (50 $\mu\text{g/ml}$) wurde mit einer Übernachtskultur des jeweiligen Expressionsklones angeimpft und bei 37°C, 220 rpm inkubiert. Durch die Zugabe von 1 mM IPTG bei einer OD₆₀₀ von 0,6 wurde die Expression des rekombinanten Proteins induziert. Nach 2 Stunden bei gleichen Inkubationsbedingungen wurde die Kultur bei 4°C und 6000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert und das Pellet bei -20°C gelagert oder direkt weiterverwendet.

6.3.1.2. Löslichkeitstest

Die Löslichkeit des jeweiligen Proteins wurde mit nicht denaturierenden und denaturierenden Puffern getestet. Dafür wurden 2 ml einer induzierten Kultur abzentrifugiert und das Pellet in 500 μl des jeweiligen Puffers aufgenommen. Die Proben wurden 30 Sekunden bei 10% Pulslänge auf Eis mit Ultraschall behandelt und anschließend bei 4°C und maximaler Umdrehungszahl für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand mit der löslichen Fraktion wurde abgenommen und mit SDS-Probenpuffer versetzt (2 Anteile Probe und 1 Anteil SDS-Probenpuffer), das Pellet wurde mit 500 μl PBS resuspendiert und ebenfalls mit SDS-Probenpuffer versetzt. 20 μl jeder Probe wurden zur Analyse auf ein SDS-Polyacrylamidgel (siehe 6.3.5.) aufgetragen.

6.3.1.3. Proteinaufreinigung mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Die betreffenden DNA-Abschnitte wurden in den Expressionsvektor pET 28a(+) ligiert. Vorher wurde der Vektor so geschnitten, daß die rekombinanten Proteine einen N-terminalen 6 x Histidin-Rest besitzen. Mit Hilfe dieses Restes konnten die rekombinanten Proteine über eine mit Nickel geladene HiTrap Chelating HP-Säule (1 ml Säulenvolumen) aufgereinigt werden.

Aufreinigung von rAv-Serpin

Das Pellet einer induzierten 250 ml-Kultur wurde in 10 ml Lysispuffer resuspendiert und nach Zugabe einer Spatelspitze Lysozym für 20 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurde die Suspension 1 Minute bei 20% Pulslänge auf Eis mit Ultraschall aufgeschlossen und zentrifugiert (15 Minuten bei 4°C, 12.000 rpm). Das Solubilisat mit dem gelösten rAv-Serpin wurde über die vorher nach den Herstellerangaben vorbereitete HiTrap Chelating HP-Säule gegeben. Die Säule wurde mit 7 ml Lysispuffer gewaschen und das gebundene Protein mit Elutionspuffer durch einen pH-Wechsel in 12 Fraktionen à 1 ml eluiert. Um das Protein zu renaturieren, enthielten die Auffanggefäße bereits 100 µl PBS, pH 8. Im Anschluß wurden die Fraktionen zweimal gegen PBS, pH 7,4 dialysiert und sterilfiltriert.

Aufreinigung von rCe-Serpin und rEt-Serpin

Der Überstand mit dem gelösten rCe-Serpin und rEt-Serpin wurde über die vorbereitete Säule gegeben. Nachdem die Säule mit 5 ml Lysispuffer gewaschen worden war, wurde eine schrittweise Reduktion der Harnstoffkonzentration mit Hilfe der Waschpuffer vorgenommen, so daß bereits auf der Säule eine Umpufferung stattfand. Dazu wurde die Säule mit je 7 ml Waschpuffer I (6 M Harnstoff) und II (4 M Harnstoff) und mit 12 ml Waschpuffer III gewaschen, der keinen Harnstoff mehr enthält. Die Elution fand durch kompetitive Verdrängung der rekombinanten Proteine durch Imidazol statt. Die 12 Fraktionen à 1 ml wurden im Anschluß zweimal gegen PBS, pH 7,4 dialysiert und sterilfiltriert.

Um den Erfolg der Dialyse zu überprüfen, wurden 2 ml Elutionspuffer mitgeführt, die später in den Tests als Negativkontrollen verwendet wurden.

6.3.2. Aufreinigung von nativem *A. viteae*-Serpine mittels Gelchromatographie

A. viteae-Weibchen-Gesamtantigen mit einer Konzentration von 20 mg/ml wurde mit Hilfe der Gelchromatographie nach dem Molekulargewicht aufgetrennt. Dazu wurden 250 μ l Antigen auf eine Superdex-Säule aufgetragen und bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 0,4 ml/min in 25 Fraktionen á 1 ml aufgefangen. Puffer (PBS, pH 7,4) und Fraktionen wurden auf Eis gekühlt.

6.3.3. Aufreinigung von nativem *A. viteae*-Serpine mittels Trypsin-Sepharose-Affinitätschromatographie

Die Bindung von Serpine an die Prototyp-Zielprotease Trypsin sollte für die Aufreinigung von nativem Serpine aus *A. viteae*-Weibchen-Gesamtantigen genutzt werden. Der Ligand Trypsin (5 mg in 1 ml Kopplungspuffer) wurde hierfür nach den Instruktionen des Herstellers an die NHS-aktivierte Säule gebunden und diese anschließend nach Protokoll gewaschen. Das *A. viteae*-Weibchen-Gesamtantigen wurde mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 0,2 ml/min aufgetragen und 10 Minuten mit dem gebundenen Trypsin inkubiert. Die Elution erfolgte durch pH-Wechsel in 9 Fraktionen á 0,5 ml. Das Volumen der übrigen, während der gesamten Aufreinigung gesammelten Fraktionen betrug 1ml.

6.3.4. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Test

Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe des BCA Protein Assay Kit nach dem Protokoll des Herstellers bestimmt.

Dabei wird die Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ durch die Peptidbindungen der Proteine in alkalischem Milieu genutzt. Der durch die entstandenen Cu^+ -Ionen gebildete farbige Chelatkomplex mit Bicinchoninsäure (BCA) wird anschließend kolorimetrisch mit Hilfe von BSA-Standardproben quantifiziert.

6.3.5. Tests zur inhibitorischen Aktivität der potentiellen Serpine

Die inhibitorische Aktivität der rekombinanten Proteine wurde getestet, indem sie mit verschiedenen, als Zielproteasen in Frage kommenden Enzymen für 30 Minuten bei 37°C inkubiert wurden. Die bestehende Restaktivität der jeweiligen Protease wurde durch die Zugabe des entsprechenden pNA(para-Nitroanilid)-gekoppelten Substrates ermittelt. Die aktive Protease spaltete durch Umsetzen des Substrates den pNA-Rest ab, was zu einer Gelbfärbung des vorher farblosen Reaktionsansatzes führte. Die Intensität der Färbung und somit die verbliebene Restaktivität der Protease wurde kolorimetrisch festgestellt ($\lambda=405$ nm) und mit einem mitgeführten Ansatz ohne rekombinantes Protein verglichen. Damit das Gesamtvolumen (115 μ l) der Reaktionsansätze trotz der verschiedenen Mengen an eingesetztem Protein konstant blieb, wurde das jeweilige Restvolumen mit Reaktionspuffer aufgefüllt. Als Blank für den ELISA Reader wurde ein Ansatz aus pNA-gekoppeltem Substrat und Reaktionspuffer benutzt. Pro Ansatz wurden zwei Messungen durchgeführt, aus denen der Mittelwert berechnet wurde.

Die Kombination der Proteasen, Substrate und Reaktionspuffer war wie folgt:

Protease	Konzentration in 5 μ l	pNA-gekoppeltes Substrat	Konzentration in 10 μ l	Reaktionspuffer
Trypsin	40 nM	BAPNA	92 μ M	} PBS, pH 7,4
Papain	2,4 μ M	BAPNA	92 μ M	
Chymotrypsin	2 nM	Suc-AAPF-pNA	560 μ M	
Cathepsin G	50 nM	Suc-AAPF-pNA	560 μ M	
HNE	20 nM	Suc-AAV-pNA	833 μ M	
PPE	20 nM	Suc-AAA-pNA	177 μ M	0,2 M Tris, pH 7,5

6.3.6. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Analyse von Proteinen wurden diese nach ihrem Molekulargewicht in der SDS-PAGE aufgetrennt. Dabei wurde das diskontinuierliche Puffersystem nach Laemmli (1970) und Minigel-Apparaturen eingesetzt. Die Proben wurden mit 2 x Probenpuffer im Verhältnis 2:1 gemischt, 5 Minuten gekocht und zentrifugiert bevor sie auf das Gel aufgetragen und bei 120 V aufgetrennt wurden. Das Molekulargewicht der Proteine wurde anhand eines als Standard mitgeführten Markers bestimmt. Um die Proteine optimal darzustellen, variierten die

Trenngele zwischen 10% und 14%, die Sammelgele waren 6%ig. Die Proteine wurden nun mit Coomassie für mindestens 1 Stunde gefärbt, überschüssige Färbelösung wurde im Entfärbegrad aus dem Gel entfernt und das Gel getrocknet.

6.4. Immunologische Methoden

6.4.1. Western-Blot

Nachdem die Proteine in der SDS-PAGE aufgetrennt worden waren, wurden sie für den Nachweis mit spezifischen Antikörpern auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Hierbei kamen das Tank-Blot- und das Semi-Dry-Verfahren zur Anwendung, die Transferzeit betrug bei einer Stromstärke von 80 mA 14 bis 16 Stunden (Tank-Blot) bzw. 45 Minuten (Semi-Dry). Die Absättigung freier Bindungsstellen auf der Membran erfolgte mittels 5% Milchpulver+TBS über 30 Minuten. Nach dem Waschen mit TBS+Triton wurde die Membran 1,5 Stunden mit dem ersten Antikörper (BALB/c-Serum: 1:200, Maus Anti-6 x His-Antikörper: 1:2000 in 5% Milchpulver+TBS), nach erneutem Waschen wiederum 1,5 Stunden mit dem zweiten, AP-konjugierten Ziege Anti-Maus-IgG-Antikörper (1:5000 in 5% Milchpulver+TBS) bei Raumtemperatur inkubiert. Vor dem Entwickeln mit BCIP/NBT wurde die Membran mit TBS gewaschen und kurz in Entwicklungspuffer equilibriert. Die Farbreaktion wurde mit Wasser gestoppt und die Membran getrocknet.

6.4.2. Immunisierung von BALB/c-Mäusen

BALB/c-Mäuse wurden im Alter von 8 Wochen dreimal im Abstand von 2 Wochen mit je 25 μg rekombinantem Protein immunisiert. Dazu wurde das in PBS gelöste Protein in 250 μl des Adjuvans Alum aufgenommen und nach 30-minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur den Tieren subkutan injiziert. 2 Wochen nach der letzten Immunisierung wurden die Tiere ausgeblutet, das Blut über Nacht bei 4°C agglutiniert und bei Raumtemperatur für 20 Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert. Das Serum wurde bei -20°C gelagert.

6.4.3. Zytokin-ELISA

Kulturüberstände von Mitogen- und Antigen-spezifisch stimulierten Mausmilzzellen wurden nach 48 Stunden abgenommen und mit einem kommerziellen ELISA-Set nach den Herstellerangaben auf ihre IL-10-Konzentration geprüft.

6.5. Methoden der Zellkultur

6.5.1. Präparation von Mausmilzzellen

Für die Gewinnung von Milzzellen wurden Mäuse mit Kohlendioxid getötet und in 70% Ethanol desinfiziert. Die Milz wurde steril aus dem Tier entnommen und mit einem Glasstempel durch ein engmaschiges Sieb passiert. Die entstandene Milzzellsuspension wurde in komplettem RPMI suspendiert und anschließend mit kaltem RPMI auf 40 ml aufgefüllt. Während einer 10-minütigen Inkubation auf Eis sanken größere Gewebeteile ab. Um diese zu entfernen, wurde der Überstand in ein neues 50 ml-Reaktionsgefäß überführt und dann für 10 Minuten bei 4°C und 1200 rpm zentrifugiert. Das Milzzellpellet wurde nach Verwerfen des Überstandes in der verbliebenen Restflüssigkeit resuspendiert und für 10 Minuten mit 10 ml Erythrozytenlyse auf Eis gestellt. Noch verbliebene größere Gewebeteile wurden mit einer sterilen Pasteurpipette entfernt, die Suspension zentrifugiert und die Milzzellen zweimal mit RPMI gewaschen bevor sie in 10 ml RPMI komplett aufgenommen wurden. Die Zellen wurden mit Trypanblau gefärbt (1:10 Verdünnung) und alle vitalen, nicht angefärbten Zellen in einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

6.5.2. Polyklonale Stimulation

Eine 96-Loch-Flachbodenplatte wurde mit $3,5 \times 10^5$ Zellen pro Loch bestückt. Bis auf die RPMI-Kontrolle wurden die Milzzellen mit dem Mitogen ConA ($2 \mu\text{g/ml}$) stimuliert und der Einfluß von rAv-Serpin, rCe-Serpin und rEt-Serpin in verschiedenen Konzentrationen auf die Stimulation überprüft. Das Gesamtvolumen pro Loch betrug $200 \mu\text{l}$. Die Zellen wurden für 68 Stunden bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt in der Luft inkubiert. Dabei wurde den Zellen für die

letzten 20 Stunden 1 μCi ^3H -Thymidin pro Loch zugegeben, um später die Proliferation der Zellen bestimmen zu können.

6.5.3. Antigen-spezifische Stimulation

Bei der Stimulation von Mausmilzzellen mit dem Antigen OVA wurden Ovalbuminrezeptor-transgene Mäuse (Stamm TGN Do 11.10) verwendet, deren T-Zellen aufgrund eines transgenen Ovalbuminrezeptors Hühner-Ovalbumin erkennen. Die Milzzellen wurden in 96-Loch-Rundbodenplatten pipettiert und mit 1 μM OVA stimuliert. Die Inkubation der Zellen erfolgte für insgesamt 92 Stunden. Die Vorgehensweise entsprach im Übrigen der bei der polyklonalen Stimulation.

6.5.4. Ernten ^3H -Thymidin-markierter Zellen und Szintillationsmessung

Durch den Einbau von ^3H -Thymidin in die Zell-DNA konnte die Proliferationsrate der Milzzellen bestimmt werden. Dazu wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellernters auf einen Glasfaserfilter übertragen. Nach dem Trocknen des Filters (1 Stunde bei 60°C) wurde eine Szintillationsmembran aufgeschmolzen und anschließend die Menge an eingebautem ^3H -Thymidin im Beta-Counter gemessen.

6.6. Datenverarbeitung

Die Bearbeitung der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen erfolgte mit dem Programm MacVector™, der Abgleich der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen mit dem NCBI Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov) und der Gene DB des Sanger-Instituts (www.genedb.org). Signalsequenzen wurden mit den Programmen HUSAR (Biocomputing Service Group) und SignalP V 2.0 (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP) ermittelt und die Versuche mit dem Tabellenkalkulationsprogramm EXCEL ausgewertet.