

3. Material und Methoden

3.1 Geräte

Die in dieser Arbeit eingesetzten Geräte sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tab. 1): Geräte folgender Hersteller wurden verwendet.

Analysenwaage	Chyo, JL 180
Autoklav	Teknomara
Cleanbench	Nunc Intermed
Durchflusszytometer (FACScan)	Becton-Dickinson
Elektrophoresekammern	Institutswerkstatt, Pharmacia, Biorad
Elektroporationsgerät	Biorad, Gene Pulser Transfection
Entwicklermaschine	Agfa, Curex 60
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 25, Zeiss, Zeiss Filtersets 00 und 10, Kamera: Intas Lowlight CCD
Fluorimeter	SPEX FluoroMax Fluorimeter
French®-Pressure Cell Press	SLM Aminco, SLM Instruments, Inc.
Gefrierschrank -20°C	Privileg Senator
Gefrierschrank -70°C	REVCO
Geldokumentation	Gel Doc 2000, BioRad
Gel-Elektrophorese-Apparatur	BioRad, Pharmacia GNA-100
Geltrockner	BioRad
Grobwaage	Chyo Electronic Balance MP-3000
Hybridisierungsofen	Hybaid Mini 10
Inkubationsschränke	Heraeus, Memmert
Magnetrührer	Janke und Kunkel KMO 2 electronic
Mikrowellenofen	Phillips M630
Netzgeräte	Consort E 452, Pharmacia, Biorad Power pac 300
PCR-Thermocycler	Techne, Progene, Eppendorf, Mastercycler personal
pH-Meter	WTW pH 525
Photometer	Unicam 8625
Rotationsschüttler	innOVA 4300 Incubator Shaker
	IKA Labortechnik KS501 digital
	Univapol 150 H Uniequip
	Eppendorf-Thermostat 5320
	Eppendorf 5415, Heraeus Biofuge, Pico
	BioRad
	Branson, Niederlande
Speedvac	
Tischinkubator	
Tischzentrifuge	
UV-Crosslinker	
Ultraschall Desintegrator Branson Sonifier W 250	
UV-Transilluminator	Appligene, Frankreich
Vacuum Pumpe	Univac Uniequip
VacuGene XL-Blotting-System	Pharmacia LKB, Freiburg
Videoprintanlage	Mitsubishi, Hitachi, Cybertech Cb1
<u>Zentrifugen</u> : J2-21 Kühlzentrifuge, Rotoren JA 10, JA 20	Beckmann, USA, Heraeus

3.2 Bakterienstämme:

Die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Laborstämme und die dazugehörige Herkunft und Referenz sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tab. 2): Verwendete *E. coli*-Laborstämme.

<i>E. coli</i> K-12-Stamm	Geno- bzw. Phänotyp	Referenz/Herkunft
DH5 α	F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk-, mk-), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , λ^- , Δ (<i>argF-lac</i>)U169, Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15	Bethesda, Research Laboratories, 1986
SY327 <i>Ipir</i>	F ⁻ , <i>araD</i> , Δ (<i>lac-pro</i>), <i>argE</i> (Am), Rif ^r , <i>nalA</i> , <i>recA56</i> , <i>Ipir</i>	Miller & Mekalanos, 1988
SM10 <i>Ipir</i>	<i>thi1</i> , <i>thr1</i> , <i>leuB6</i> , <i>supE44</i> , <i>tonA21</i> , <i>lavY1</i> , <i>recA</i> ::RP-4-2-Tc::Mu, Km ^r , <i>Ipir</i>	Miller & Mekalanos, 1988

Die in dieser Arbeit verwendeten oder hergestellten *Legionella*-Stämme sind in nachfolgender Tabelle aufgeführt.

Tab. 3): In dieser Arbeit erzeugte und verwendete *Legionella*-Stämme.

Stammbezeichnung	Geno- bzw. Phänotyp	Referenz/Herkunft
<i>L. pneumophila</i> PhilI JR32	Restriktionsdefizientes Derivat von <i>L.p. Philadelphia</i> I (Sm ^r)	Marra and Shuman, 1989
<i>L. pneumophila</i> PhilI JR32 25D	Avirulentes salzresistentes Isolat	Horwitz 1987
<i>L. pneumophila</i> PhilI JR32-2	Mip-negative Mutante von <i>L.p. PhilI JR32</i> (Sm ^r , Km ^r)	Eva Wintermeyer Diss. 1994
<i>L. pneumophila</i> PhilI JR32-2.1	<i>L.p. PhilI JR32-2</i> komplementiert mit pEWMS 102 (Mip WT) (Sm ^r , Km ^r , Cm ^r)	Eva Wintermeyer Diss. 1994
<i>L. pneumophila</i> PhilI JR32-2.2	<i>L.p. PhilI JR32-2</i> komplementiert mit pEWMS 205-A (Mip Y185-A) (Sm ^r , Km ^r , Cm ^r)	Eva Wintermeyer Diss. 1994
<i>L. pneumophila</i> PhilI JR32-2.3	<i>L.p. PhilI JR32-2</i> komplementiert mit pEWMS 162-L (Mip D142-L) (Sm ^r , Km ^r , Cm ^r)	Eva Wintermeyer Diss. 1994
<i>L. pneumophila</i> PhilI JR32-2.4	<i>L.p. PhilI JR32-2</i> komplementiert mit pRK105 (Mip _{1-4,77-238}) (Sm ^r , Km ^r , Cm ^r)	diese Arbeit
<i>L.pneumophila</i> PhilI JR32 (pRK6(pBC(<i>gfp</i>)))	<i>L.p. PhilI JR32</i> transformiert mit pRK6(pBC(<i>gfp</i>)) (Sm ^r , Cm ^r)	diese Arbeit
<i>L. pneumophila</i> PhilI JR32 (pRK10(pBC(<i>gfp</i>))-P _{mip}))	<i>L.p. PhilI JR32</i> transformiert mit pRK10(pBC(<i>gfp</i>))-P _{mip}) (Sm ^r , Cm ^r)	diese Arbeit

<i>L. pneumophila</i> PhilII JR32-2 (pRK10(pBC(<i>gfp</i>)-P _{mip}))	<i>L.p.</i> PhilII JR32-2 transformiert mit pRK10(pBC(<i>gfp</i>)-P _{mip}))(Sm ^r , Cm ^r)	diese Arbeit
<i>L. pneumophila</i> PhilII JR32-2(pRK78)	<i>L.p.</i> PhilII JR32-2 transformiert mit pRK78 (Sm ^r , Cm ^r)	diese Arbeit
<i>L. pneumophila</i> PhilII JR32 25D(pRK10(pBC(<i>gfp</i>)-P _{mip}))	<i>L.p.</i> PhilII JR32 25D transformiert mit pRK10(pBC(<i>gfp</i>)-P _{mip})) (Sm ^r , Cm ^r)	diese Arbeit
<i>L. pneumophila</i> PhilII JR32 (pRK58(pBC(<i>gfp</i>)-P _{sod}))	<i>L.p.</i> PhilII JR32 transformiert mit pRK58(pBC(<i>gfp</i>)-P _{sod})) (Sm ^r , Cm ^r , Tc ^r)	diese Arbeit
<i>L. pneumophila</i> PhilII JR32-2 (pRK110)	<i>L.p.</i> PhilII JR32-2 transformiert mit pRK110(pBC(<i>gfp</i> mut3(LVA)-P _{mip})) (Sm ^r , Cm ^r)	diese Arbeit
<i>L. pneumophila</i> Corby	virulentes Patientenisolat Serogruppe 1	Jepras et al. 1985
<i>L. pneumophila</i> Corby-1	Mip-negative Mutante von <i>L.p.</i> Corby (Rif ^r , Km ^r)	Eva Wintermeyer Diss. 1994
<i>L. pneumophila</i> Corby (pRK10(pBC(<i>gfp</i>)-P _{mip}))	<i>L.p.</i> Corby transformiert mit pRK10(pBC(<i>gfp</i>)-P _{mip}))(Rif ^r , Cm ^r)	diese Arbeit
<i>L. pneumophila</i> Corby-1 (pRK10(pBC(<i>gfp</i>)-P _{mip}))	<i>L.p.</i> Corby-1 transformiert mit pRK10(pBC(<i>gfp</i>)-P _{mip}))(Rif ^r , Cm ^r , Km ^r)	diese Arbeit
<i>L. pneumophila</i> Corby KH1 (pRK10(pBC(<i>gfp</i>)-P _{mip}))	<i>L.p.</i> Corby-KH1 transformiert mit pRK10(pBC(<i>gfp</i>)-P _{mip}))(Rif ^r Cm ^r , Km ^r)	diese Arbeit
<i>L. pneumophila</i> Wadsworth NU201(pRK10(pBC(<i>gfp</i>)-P _{mip}))	<i>L.p.</i> Wadsworth NU201 transformiert mit pRK10(pBC(<i>gfp</i>)-P _{mip})	diese Arbeit
<i>L. pneumophila</i> Wadsworth NU203(pRK10(pBC(<i>gfp</i>)-P _{mip}))	<i>L.p.</i> Wadsworth NU203 transformiert mit pRK10(pBC(<i>gfp</i>)-P _{mip})	diese Arbeit

3.3 Vektoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Klonierungsvektoren sind in der Tabelle 4 aufgeführt.

Tab. 4): In dieser Arbeit verwendete Vektoren.

Bezeichnung	Charakteristika	Referenz/Herkunft
pUC 18/19	Ap ^r ; <i>lacZ</i> -Gen	Pharmacia, Freiburg
pBC KS+	Cm ^r ; <i>lacZ</i> -Gen; T7, T3-Promoter	Stratagene, La Jolla, Calif.
pGEMTeasy	Ap ^r ; <i>lacZ</i> -Gen; P _{lac}	Promega, Heidelberg
pMSS704-1	Ap ^r ; <i>cat</i> -Gen (aus Tn1725)	Mahan <i>et al.</i> 1993
pAM6 (Derivat von pBlueskriptII KS)	Ap ^r ; Gentamicin Casette	Marra & Shuman, 1997

3.3.1 Rekombinante Plasmide

In dieser Arbeit erzeugte rekombinante Plasmide sind nachfolgend aufgeführt und die für die Amplifikation verwendeten Primer angegeben.

Tab. 5): Erzeugte und verwendete rekombinante Plasmide.

Bezeichnung	Vektor	Charakteristika	Referenz/Quelle
pJMF2	pBC KS	1.5 kB (<i>XbaI/SacI</i>)	Fanghänel, 1998
pRK6(pBC(<i>gfp</i>))	pBC KS	<i>L.p.</i> FKBP25 _(-20-3, 80-213) 0.75 kB <i>gfp</i> mut2 , GFP5'(<i>XbaI</i>)/GFP3'(<i>PstI</i>)	diese Arbeit
pRK10(pBC(<i>gfp</i>)-P _{<i>mip</i>})	pBC KS	<i>gfp</i> mut2 und Mip Promoter-Sequenz Mip5'375/ Mip3'822	diese Arbeit
pRK30	pGEMTeasy	1.2 kB, <i>mip</i> -Gen Mip5'581/Mip3'1731	diese Arbeit
pRK31	pGEMTeasy	1.2 kB <i>mip</i> -Gen Mip5'663/Mip3'1828	diese Arbeit
pRK50	pGEMTeasy	0.75 kB <i>gfp</i> -Gen, GFP5'(<i>bglII</i>) und M13 reverse primer	diese Arbeit
pRK54	pUC18	1.8 kB Mip::GFP Fusionsprotein, Mip5'375/GFP3'	diese Arbeit
pRK58	pBC KS	<i>gfp</i> mut2 und <i>sod</i> Promoterseq., 2.8 kB <i>EcoRI</i> -Frag. mit Tc ^r aus pBE 16	Bubert, 1998
pRK62	pBC KS	1.8 kB Mip::GFP Fusionsprotein, Mip5'375/GFP3'	diese Arbeit
pRK78	pBC KS	1.8 kB Mip::GFP Fusionprotein, GFP5'(met-)	diese Arbeit
pRK79	pBC KS	1.8 kB Mip::GFP Fusionprotein, GFP5'(EFLQ)	diese Arbeit
pRK80	pBC KS	1.8 kB Mip::GFP Fusionprotein, GFP5'(SLRE)	diese Arbeit
pRK100	pGEMTeasy	1.2 kB „site-Mip“, Mip1017(M38M)/ Mip1018(M42A)	diese Arbeit
pRK101	pGEMTeasy	1.2 kB „site-Mip“, Mip1017(M38A)/ Mip1018(M42A)	diese Arbeit
pRK105	pMSS704-1	1.5 kB <i>L.p.</i> FKBP25 _{-20-3, 80-213} <i>XbaI/SacI</i> -Fragment	diese Arbeit
pRK109	pBC KS	<i>XbaI/HindIII gfp</i> mut3(LVA)- Fragment	diese Arbeit
pRK110	pBC KS	<i>XbaI/HindIII gfp</i> mut3(LVA)-Frag. und Mip Prom. Mip5'375/Mip3'822	diese Arbeit
pRK111	pBC KS	1.8 kB Mip::GFP Fusionprotein, GFP5'(SGQEA)	diese Arbeit
pRK115	pGEMTeasy	1.2 kB „site-Mip“, Mip946(S15A)/ Mip947(S17)	diese Arbeit
pRK116	pGEMTeasy	1.2 kB „site-Mip“, Mip1012(A37F)/ Mip1013(A39)	diese Arbeit
pRK117	pGEMTeasy	1.2 kB „site-Mip“, Mip988(Y16F)/ Mip989(D44A)	diese Arbeit

pRK118	pGEMTeasy	1.2 kB „site-Mip“, Mip961(K11A)/ Mip962(D32A)	diese Arbeit
pRK123	pGEMTeasy	1.2 kB „site-Mip“, Mip1017(M38E)/ Mip1018(M42E)	diese Arbeit

3.4 Chemikalien

Die während dieser Arbeit benötigten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Becton-Dickinson, Augsburg; Boehringer Mannheim, Mannheim; Difco, Augsburg; Fluka, Deisenhofen; Gibco BRL, Eggenstein; Merck, Darmstadt; Oxoid, Wesel; Roth, Karlsruhe; Serva, Heidelberg; Sigma, Deisenhofen.

Die Enzyme folgender Firmen wurden verwendet: Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig; Boehringer Mannheim, Eurogentec, Gibco BRL, Eggenstein; Promega, Heidelberg; Qiagen, Hilden.

Folgende Kits wurden verwendet:

- „ECLTM Direct Nucleic Acid Labeling And Detection System“, Amersham, Braunschweig
- „GeneClean[®] Kit“, Dianova, Hamburg
- „SureCloneTM Ligation Kit“, Pharmacia Biotech, Freiburg
- „Thermo Sequenase Kit“, Amersham, Braunschweig.

3.4.1 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tab.6): Verwendete Antikörper.

Bezeichnung	Hersteller/Quelle
Ziege-Anti-Maus-HRP-AK (sek. AK)	Dako (Hamburg)
Schwein-Anti-Kaninchen-HRP-AK (sek. AK)	Dako (Hamburg)
polyklonales-Anti-Mip (Kaninchen)	Bubert, B. (Würzburg)
monoklonaler-Anti-Mip (2D8)	Bubert, B. (Würzburg)
monoklonaler-Anti-Mip (32/2)	Helbig, J. (Dresden)
monoklonaler-Anti-Mip (22/1)	Helbig, <i>et al.</i> , 1995
monoklonaler-Anti-Mip (23/1)	Helbig, <i>et al.</i> , 1995
monoklonaler-Anti-Mip (38/6)	Helbig, J. (Dresden)
monoklonaler-Anti-Mip (20/2)	Helbig, <i>et al.</i> , 1995
monoklonaler-Anti-Mip (20/5)	Helbig, <i>et al.</i> , 1995
monoklonaler-Anti-Mip (48/2)	Helbig, J. (Dresden)
polyklonal-Anti-Lcy (280)	Bubert, B. (Würzburg)

3.4.2 Größenmarker

Für die Bestimmung von DNA-Fragmentgrößen in Agarosegelen wurde die 1 kB-Leiter von Gibco und als Molekulargewichtsstandard zur Proteingrößenbestimmung der „Rainbow coloured protein molecular weight marker RPN 800“ von Amersham eingesetzt.

Tab.7): In dieser Arbeit verwendete DNA und Protein-Größenstandards.

Fragment	Größe in kB	Proteingröße in kDa	Farbe
1	10.00	250	Blau
2	8.00	160	Rot
3	6.00	105	Grün
4	5.00	75	Gelb
5	4.00	50	Purpur
6	3.50	35	Blau
7	3.00	30	Orange
8	2.50	25	Grün
9	2.00	15	Blau
10	1.50	10	Rot
11	1.00		
12	0.75		
13	0.50		
14	0.25		

3.4.3 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech bezogen. Unterstrichene Sequenzbereiche enthalten eingeführte Schnittstellen für Restriktionsenzyme. In einer Standard PCR-Reaktion wurden 50-100 pmol der Primer eingesetzt.

Tab.8): In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotidprimer.

- Oligonukleotidprimer zum Sequenzieren (IRD 800)

Bezeichnung	DNA-Sequenz
M13-Universal primer	5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'
M13-Reverse primer	5'-GGA AAC AGC TAT GAC CAT G-3'
GFP3'190	5'-CCT TCG GGC ATG GCA CTC TTG-3'
Mip5'1360	5'-CAG GTT TCA CAA GTT ATC CCA GG-3'
cat5'RE	5'-CCG AGT CCC GAC CAG ACT GCA TAA-3'
cat3'RE	5'-CTC GCT GCG TTG GTA CCT AAG CCG-3'

- Oligonukleotidprimer für Amplifizierung und Klonierung von *gfp*-Konstrukten.

Bezeichnung	DNA-Sequenz
GFP5'	5'-GAG ATA TAC ATG CAT GTA AAG GAG-3'
GFP3'	5'-TGG ACA TTT ATG CAT ATA GTT CAT-3'
GFP5'(bgIII)	5'-GAT <u>AGA TCT</u> ATG AGT AAA GGA GAA G-3'
GFP5'met-(bgIII)	5'-GAT <u>AGA TCT</u> GCA AGT AAA GGA GAA G-3'
GFP5'(EFLQ) (bgIII)	5'-GAT <u>AGA TCT</u> GAA TTC CTG CAG ATG AGT AAA GGA GAA GAA CTT TTC ACT-3'
GFP5'(SLRE) (bgIII)	5'-GAT <u>AGA TCT</u> TCC CTG CGT GAA ATG AGT AAA GGA GAA GAA CTT TTC ACT-3'
GFP5'(SGQEA) (bgIII)	5'-GAT <u>AGA TCT</u> TCA GGT CCA GAA GAA GCT AGT AAA GGA GAA GAA CTT TTC ACT-3'

- Oligonukleotidprimer für die Amplifizierung und Klonierung von *mip*-Konstrukten.

Bezeichnung	DNA-Sequenz
Mip5'663 (<i>Xba</i> I)	5'-GGG CAA <u>GTC TAG AAG</u> GAT ATT ACC-3'
Mip5'581(<i>Xho</i> I)	5'-GAG <u>CTC GAG</u> GGC CCA ATT CC-3'
Mip5'1360	5'-CAG GTT TCA CAA GTT ATC CCA GG-3'
Mip5'375 (GFPM1) (<i>Sac</i> I)	5'-CTT <u>GAG CTC</u> ATG GAG GCA GGA TC -3'
Mip3'822 (GFPM2) (<i>Xba</i> I)	5'-GTT <u>CTA GAC</u> TTA AGT TCT CAT AC -3'
Mip5' <i>gst</i> (<i>Bam</i> HI)	5'-XGA <u>GGA TCC</u> GCA ACC GAT GCC ACA TCA TTA-3'
Mip3' <i>gst</i> (<i>Sal</i> I)	5'-ATC <u>GTC GAC</u> TTA AGA TGA TTT TTT CAC TG-3'
Mip3'1834(<i>Sac</i> I)	5'-TTA <u>GAG CTC</u> CCG TCG CAA GCA CTG-3'
Mip3'1828(<i>Not</i> I)	5'-GCT <u>GCG GCC GCA</u> AGC ACT G-3'
Mip3'1650(<i>Sac</i> II)	5'-CGT <u>CCG CGG</u> TGT TAG GCT GAC ACC-3'
Mip3'1731(<i>Cl</i> aI)	5'-GAA <u>ATC GAT</u> AAA CAG GCG CTT G-3'
Mip3'1540(<i>bg</i> III)	5'-TAA <u>GAT CTT</u> TTT TTC ACT GAA ATT AAG TG-3'
Mip3'(Nde1)	5'-AAC <u>ATA TGA</u> GAT GAT TTT TTC CAC TG-3'
Mip3'95AS(<i>bg</i> III)	5'-TTC <u>AGA TCT</u> ACG CTT TGC CAT C-3'
Mip3'912 (<i>bg</i> III)	5'-GTG <u>AGA TCT</u> GTT GCA GCC ATT GCT-3'
Mip2 92(<i>Xba</i> I)	5'-ATT <u>CTA GAA</u> ACT CAG TTG CTG -3'

- Oligonukleotidprimer für die „site-spezifische“ Mutagenese des *mip*-Gens.

Bezeichnung	DNA-Sequenz
Mip1018(Met42)	5'-AGG CAT GCA AGA CGC TAT GAG T-3'
Mip1018(Ala42)	5'-AGG CGC GCA AGA CGC TAT GAG T-3'
Mip1017(Met38)	5'-TTA GCC ATT GCT TCC GGA TTA ACA-3'
Mip1017(Ala38)	5'-TTA GCT GCA TCC GGA TTA ACA-3'
Mip946(S15/Ala)	5'-ATA AGC CAA CTT ATC CTT G-3'
Mip947(S17)	5'-AGC ATT GGT GCC GAT TTG-3'
Mip1006(N34/Asp)	5'-TTC CGG ATC AAC ATC TAT GCC TTG-3'
Mip1007(P37)	5'-GCA ATG GCT AAA GGC ATG-3'
Mip1013(A39)	5'-GCT AAA GGC ATG CAA GAC-3'

Mip1012(A37/Phe)	5'-CAT GAA TTC CGG ATT AAC ATC-3'
Mip961(K11/Ala)	5'-ATC GGC ACC AAT GCT ATA AGA CAA CTT ATC <u>CGC</u> GTC TGT-3'
Mip962(D32/Ala)	5'TTG GGG AAG AAT TTT AAA AAT CAA GGC ATA <u>GCT</u> GGT AAT-3'
Mip988(Y16/Phe)	5'-GCC TTG ATT TTT AAA ATT CTT CCC CAA ATC GGC ACC AAT GCT AAA AGA CAA-3'
Mip989(D44/Ala)	5'-ATA GAT GTT AAT CCG GAA GCA ATG GCT AAA GGC ATG CAA GCT GCT ATG-3'
Mip1017(M38Glu)	5'-TTA GCT TCT GCT TCC GGA TTA ACA-3'
Mip1018(M42Glu)	5'-AGG CGA ACA AGA CGC TAT GAG T-3'

Für die verwendeten Primer sind die jeweiligen 5' Startpunkte innerhalb der *mip* Sequenz aus Engleberg *et al.*, 1989 angegeben (vgl. Anhang).

3.5 Medien

3.5.1 LB-Medium für die Anzucht von *E. coli*

<u>LB-(Luria Bertani) Medium</u>	10 g/l	Caseinhydrolysat
	5 g/l	Yeast extract
	5 g/l	NaCl

Für die Herstellung von Agarplatten werden jeweils 14g/l Agar zugegeben.

3.5.2 A(C)IX-Medium

Ein wichtiges Selektionsmerkmal für die Klonierung von Insert-DNA tragenden Vektoren (pUC 18/19, pGEMTeasy oder pBC KS) ist ihre Kultivierung auf A(C)IX-Platten. Hierbei kommt es aufgrund der Insertion von Fremd-DNA zu einem Verlust der Fähigkeit des Vektors, enzymatisch aktive β -Galactosidase zu bilden. Deshalb können chromogene Substrate wie X-Gal nicht mehr abgebaut werden und die Kolonien bleiben weiß. Zellen hingegen, die keine Insert-DNA tragen, färben sich aufgrund des Abbaus von X-Gal durch die β -Galactosidase blau. Das Substratanalogon IPTG interagiert mit dem durch das Gen *lacI* codierten Repressor, der dadurch die Fähigkeit verliert, an den Operator zu binden und ermöglicht somit die Induktion der Transkription der inserierten Gene. Durch Zugabe von Ampicillin oder Chloramphenicol wird auf Insert tragende Zellen selektioniert.

<u>X-Gal-Platten:</u>	1 l	LB-Agar
	500 µl/l	100 mM IPTG (Isopropyl-β-D Thiogalactopyranosid)
	1-2 ml/l	X-Gal (5-Bromo-4 Chloro- 3 Indolyl-β Galactosid 2% in Dimethylformamid DMF)

Zusatz der Antibiotika erst nach dem Autoklavieren.

3.5.3 Antibiotika

Für die Selektion auf Vektor-tragende Bakterien wurden folgende Antibiotika-Zusätze in den Nährmedien verwendet.

	<i>E. coli</i>	<i>Legionella</i>
Ampicillin	50-100 µg/ml	
Kanamycin	50 µg/ml	10 µg/ml
Chloramphenicol	25 µg/ml	5-12.5 µg/ml
Gentamicin	20µg/ml	5-10µg/ml

3.5.4 Medien für die Anzucht von *Legionella*

3.5.5 ACES-Yeast-Extract (AYE)-Flüssigmedium (pH 6.9)

	5 g/l	ACES
	5 g/l	Yeast extract
• ad. H ₂ O _{bidest.} auf 1000 ml, pH mit 10 N KOH auf 6.9 einstellen		
• nach dem Autoklavieren Zugabe von (sterilfiltriert)	0.4 g/l	L-Cystein
	0.25 g/l	Eisen(III)pyrophosphat

3.5.6 Buffered-Charocal-Yeast-Extract (BCYE) (pH 6.9)-Agarplatten

	5 g/l	ACES
	10 g/l	Hefeextrakt
• ad. H ₂ O _{bidest.} auf 900 ml, pH mit 10 N KOH auf 6.9 einstellen		
• Zugabe von H ₂ O _{bidest.} ad. auf 1000 ml	2 g/l	Aktivkohle
	12 g/l	Agar
• nach dem Autoklavieren Zugabe von (sterilfiltriert)	0.4 g/l	L-Cystein
	0.25 g/l	Eisen(III)NO ₃

3.5.7 Zellkulturmedien

3.5.7.1 PYG-712 Medium für *Acanthamoeba castellanii*

	10 ml	0.4 M MgSO ₄
	10 ml	5 mM NH ₄) ₂ Fe ^{II} (SO ₄) ₂
	10 ml	0.25 M Na ₂ HPO ₄
	10 ml	0.25 M KH ₂ PO ₄
	8 ml	50 mM CaCl ₂
• <u>Amöbepuffer</u> ad.1000 ml H ₂ O _{bidest.}	1 g	Na ₃ -Citrat
	20 g	Proteose-Peptone
	1 g	Hefeextrakt
• Zugabe von 900 ml H ₂ O _{bidest.}		
• Autoklavieren und Zugabe von	50 ml	2 M Glucose

Amöbepuffer: PYG 712 Medium ohne Proteose Peptone, Hefeextract und Glucose.

Die Amöben werden in 75 ml Zellkulturflaschen bei Raumtemperatur angezogen. In Abständen von ca. 1-2 Wochen wird eine neue Subkultur inokuliert. Da die Amöben sowohl adherent als auch in Suspension vorliegen, sollten die Amöben durch kräftiges Klopfen von der Plastikoberfläche abgelöst werden. Mit 0.5 ml dieser Amöbensuspension werden 20 ml frisches PYG-Medium beimpft. Für die Durchführung von Invasionsassays wird die Anzahl der Amöben pro ml mittels einer Zählkammer (Fuchs-Rosenthalkammer) bestimmt und durch Zugabe von PYG-Medium auf einen Wert von 1×10^5 Zellen / ml eingestellt. Je 1 ml dieser Suspension wird in die Näpfe einer „24 well“ Platte pipettiert und ÜN bei RT inkubiert. Während dieser Zeit adherieren die Amöben erneut an der Plastikoberfläche und können nun für eine Infektion verwendet werden.

3.5.7.2 PYNFH Medium (ATCC #1034) für *Hartmannella vermiformis*

<u>Lösung I:</u>	10 g	Bacto peptone (Difco)
	10 g	Hefeextract (Difco)
	1 g	Ribonucleic acid
	15 mg	Folsäure
	1 mg	Hemin
• ad. 880 ml H ₂ O _{bidest.} , autoklavieren		
<u>Lösung II:</u>	18.1 g	KH ₂ PO ₄
	25 g	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
• ad. 1000 ml H ₂ O _{bidest.} , autoklavieren		

Nachdem die Komponenten autoklaviert wurden sind, werden 20 ml Lsg. II zu Lsg. I gegeben. Nachfolgend gibt man 100 ml „Hitze inaktiviertes“ fötales Rinder Serum (FCS) dazu und stellt einen pH von 6.5 ein und sterilfiltriert.

<u>Puck's Saline F:</u>	0.016 g	CaCl ₂ x 2 H ₂ O
	0.285 g	KCl
	0.083 g	KH ₂ PO ₄
	0.154 g	MgSO ₄ x 7 H ₂ O

- ad. 990 ml H₂O_{bidest.}, autoklavieren
- 10 ml Glucose, sterilfiltrieren und zur abgekühlten Lösung zugeben

1.1 g/10 ml Glucose
H₂O_{bidest.}

- Assay-Medium für *Hartmannella*

Puck's Saline F : PYNFH (ohne FCS !) = 1 : 1

Um optimale Wachstumsbedingungen zu gewährleisten, werden die Amöben alle 3-4 Tage in frischem PYNFH Medium subkultiviert. Für den Einsatz der Zellen in einem Invasionsassay werden diese mit Assaymedium auf eine Zellzahl von 1×10^5 / ml eingestellt und auf die Näpfe der „24-well“ Platten verteilt.

3.6 Infektion von *A. castellanii* und *H. vermiformis*

3.6.1 Aliquotierung von *Legionella* für die Infektion

Eine *Legionella*-Kultur wird auf BCYE-Agarplatten unter Zusatz der entsprechenden Antibiotika für 24-48 h bei 37°C und 5% CO₂ angezogen und mit H₂O_{bidest.} von den Platten abgeschwemmt. Die optische Dichte der Bakteriensuspension sollte zwischen 0.1 und 0.4 (OD₆₀₀) liegen und die Bakterien können nun in Aliquots zu 0.5 ml bei -80°C gelagert werden. Die Lebendzellzahl dieser „Stocks“ wird durch Ausplattieren von entsprechenden Verdünnungen auf BCYE-Agarplatten bestimmt und anhand der Zellzahl können verschiedene MOI's (0.1-100) im Verhältnis zu der Anzahl der Wirtsorganismen eingestellt werden.

3.6.2 Invasionsassay, Quantifizierung durch CFU-Bestimmung

Für die Quantifizierung des intrazellulären Wachstums von *Legionella* werden Invasionsassays innerhalb verschiedener Wirtzellsysteme durchgeführt. Dabei wachsen die Bakterien für definierte Zeiträume, 0, 24, 48 und 72 Stunden innerhalb der Wirtszellen heran, wobei die erreichte Zellzahl durch Bestimmung der CFU-Werte quantifiziert wird. Für die Infektion werden die Wirtszellen (*Acanthamoeba castellanii*) für 2 Stunden mit einer definierten Anzahl *Legionellen* (MOI 10-50) bei 37°C in Amöbenpuffer kokultiviert. Direkt nach Zugabe der *Legionellen* werden diese bei 1200 rpm für 3 min auf die Amöben zentrifugiert. Anschließend werden die extrazellulären Bakterien mit einer einstündigen Gentamicinbehandlung (100 µg/ml) abgetötet und durch nachfolgende Waschschrte unter Verwendung von Amöbenpuffer entfernt. Die Zellen werden dann osmotisch, durch Zugabe von 1 ml eiskaltem Wasser, lysiert und entsprechende Verdünnungen der insgesamt 2 ml (800 µl, 900 µl, 900µl, usw.) auf BCYE Agarplatten ausplattiert. Dieser Wert wird als Zeitpunkt Null des Infektionsverlaufs definiert. Die zu späteren Zeitpunkten entnommenen Proben werden analog behandelt und bis zum Zeitpunkt der Lyse in Amöbenpuffer kultiviert. Zur Durchführung werden „24 well“-Platten verwendet, die bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert werden.

Für die Infektion von *Hartmannella vermiformis* werden diese analog dem unter 5.7.1 beschriebenen Vorgehen in definierter Anzahl (1×10^5) auf die Näpfe der 24-well Platten verteilt und mit 5×10^4 *Legionella pneumophila* infiziert. Aufgrund der geringen MOI wird keine Gentamicin-Behandlung durchgeführt. Die Zellen werden für 3 Tage bei 35°C kokultiviert und anschließend durch Ausplattieren von seriellen Verdünnungen die CFU-Werte bestimmt. Auch hier werden die Amöbenzellen zum besseren Aufschluss durch Zugabe von eiskaltem destillierten Wasser osmotisch lysiert.

3.6.3 Invasionsassay, Quantifizierung durch FACS-Analyse

Für die Analyse der Invasionsassays von *A. castellanii* und *H. vermiformis* mit dem FACS werden diese analog wie unter 6.1 beschrieben durchgeführt. Zum Zeitpunkt der Analyse werden die „well plates“ für 10-15 min auf Eis inkubiert, um die adherenten Amöben abzulösen. Durch mehrmaliges vorsichtiges auf- und abpipettieren werden die Zellen vollständig abgelöst und die Zellsuspensionen aus den „well-plates“ in FACS Analysenröhrchen überführt. Die Messung der infizierten Zellen erfolgt am FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter).

3.6.4 Invasionsassay in Gegenwart von Phagozytose-Inhibitoren

In Gegenwart verschiedener Phagozytose-Inhibitoren soll deren Einfluss auf die Aufnahme von *L. pneumophila* in die Protozoen *A. castellanii* und *H. vermiformis* untersucht werden. Die verwendeten Inhibitoren sind Cytochalasin D (Effekte auf Mikrofilamente), Cycloheximid (inhibiert Proteinsynthese) und Methylamin, ein Inhibitor der adsorptiven Pinozytose. Für die Infektionen werden jeweils 1×10^5 *A. castellanii* Zellen vor der Infektion für mindestens 2 h mit den entsprechenden Inhibitoren bei 37°C vorinkubiert. Verwendete Konzentrationen: 100 µg/ml Cycloheximid; 5 µg/ml Cytochalasin D, 6.7-13.4 µg/ml Methylamin. Die Infektion von *A. castellanii* wird für 2 h in Gegenwart der Inhibitoren durchgeführt. Nachfolgend werden die Zellen für 1 h mit Gentamicin (80 µg/ml) ebenfalls in Gegenwart der Inhibitoren behandelt. Danach wird vorsichtig mit Amöbenpuffer gewaschen und die Zellen schließlich in Amöbenpuffer belassen. Dieser Zeitpunkt wird als Null-Wert definiert und entweder durch eine CFU-Bestimmung oder eine FACS-Analyse ausgewertet.

Für die Infektion von *H. vermiformis* (1×10^5) werden diese mit 5×10^4 *L. pneumophila* in Gegenwart der Inhibitoren für 3 Tage bei 35°C kokultiviert und anschließend durch Ausplattieren von seriellen Verdünnungen die CFU-Werte bestimmt. Auch hier werden die Amöbenzellen durch Zugabe von eiskaltem destilliertem Wasser osmotisch lysiert. Die Auswertung mittels FACS-Analyse erfolgt wie unter 3.6.2 beschrieben.

3.7 DNA-Techniken

3.7.1 Mini-Plasmidpräparation

1.5-3 ml einer *E. coli* Übernachtskultur werden 2 min bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge pelletiert. Das Pellet wird in 100 µl Lösung 1 resuspendiert und für 5 min bei RT stehen gelassen. Anschließend werden die Zellen durch Zugabe von 200 µl frisch angesetzter Lösung 2 lysiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Unter Zugabe von Lösung 3 präzipitiert lösliches Protein und kann durch Zentrifugation (5 min, 13000 rpm) sedimentiert werden. Anschließend wird der Überstand dekantiert und restliches Protein durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion abgetrennt. Die Proben werden mit 1 ml 100 % EtOH versetzt und für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Abschließend wird einmal mit 70 % EtOH gewaschen und die Plasmid DNA in einer „speed vac“ Vakuum getrocknet. Zur weiter Analyse wird die DNA in 50 µl H₂O_{bidest.} aufgenommen (Gehalt an Plasmid ca. 50 µg/ml).

Lösungen:

<u>Lösung 1:</u>	Tris/HCl (pH 8.0)	75 mM
	EDTA (pH 8.0)	30 mM
	Glucose	150 mM
<u>Lösung 2:</u>	H ₂ O	2.4 ml
	2 N NaOH	300 µl
	10 % SDS	300 µl
<u>Lösung 3:</u>	NaAC (pH 4.8)	3 M

Die Lösungen werden im Verhältnis 1:1:1 gemischt und bei RT gelagert.

3.7.2 Plasmidpräparation mit Qiagen-Säulen

Dieses Verfahren stellt eine leicht anwendbare und effiziente Methode zur schnellen Präparation von Plasmid-DNA dar. Das Verfahren beruht auf dem Prinzip einer alkalischen Lyse und nachfolgender Bindung der Plasmid-DNA an eine Säulenmatrix (Anionentauscher). Für die Präparation unterschiedlicher Mengen DNA werden Säulen mit verschiedenen Bindungskapazitäten verwendet (Qiagen-tip 20; 20 µg DNA Minipräparation und Qiagen-tip 100; 100 µg DNA Midipräparation).

Lösungen:

<u>Resuspensionspuffer P1, pH 8.0:</u>	Tris/HCl	50 mM
	EDTA	10 mM
	RnaseA	100 µg/ml
<u>Lysepuffer P2:</u>	NaOH (Pellets)	200 mM
	SDS	1 % (w/v)
<u>Neutralisationspuffer P3, pH 5.5:</u>	Kaliumacetat	3 M
<u>Waschpuffer QC, pH 7.0:</u>	NaCl	1 M
	MOPS	50 mM
	EtOH (99.8 %)	15 % (v/v)
<u>Elutionspuffer QF, pH 8.5:</u>	Tris/HCl	50 mM
	Ethanol (99.8 %)	15 % (v/v)
	NaCl	1.25 M

-Isopropanol,

-Ethanol 70 %

Für die Durchführung einer Qiagen Präparation werden entsprechend der zu präparierenden Plasmide (high- bzw. low-copy Plasmide) geeignete Anzuchtvolumina gewählt. Für eine Minipräparation von pUC-Plasmiden, eines high-copy-Plasmids, werden 3 (25-50)* ml einer

Übernachtskultur eingesetzt. Das Zellpellet wird in 300 µl (4 ml) Resuspensionspuffer (P1) aufgenommen und nach Zugabe von 300 µl (4 ml) Lysepuffer (P2) durch mehrmaliges Kippen der Eppendorfgefäße durchmischt und für 5 min bei RT inkubiert. Nach erfolgter SDS-Lyse der Zellen und Denaturierung der DNA aufgrund alkalischer Bedingungen werden 300 µl (4 ml) gekühlter Neutralisationspuffer (P3) hinzugegeben und vorsichtig durchmischt. Durch die Erhöhung des Salzgehalts und einer 15 minütigen Inkubation auf Eis, kommt es zum Ausfallen denaturierter Proteine und anderer Zellbestandteile. Die Plasmid-DNA renaturiert aufgrund ihrer geringen Größe und Ringstruktur, verbleibt somit in Lösung und kann durch Zentrifugation (15 min, 14000 rpm) von den anderen Zellbestandteilen getrennt werden. Der klare Überstand wird auf eine zuvor mit 1 (4) ml QBT-Puffer equilibrierte Qiagen-tip 20 (100-) Säule aufgetragen. Durch die folgenden Waschschrte mit 4 x 1 (2 x 10) ml QC-Puffer können Kontaminanten entfernt und die selektiv an das Säulenmaterial gebundene Plasmid-DNA durch Elution mit 800 µl Puffer QF abgelöst werden. Zur Fällung der DNA werden 0.7 VT Isopropanol zugegeben und für 30 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird nun dekantiert und das Pellet zur Entfernung von Salzen kurz mit eiskaltem 70 %igen Ethanol gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Für analytische Zwecke kann das Pellet in 50 µl A. bidest. aufgenommen oder getrocknet bei -20°C gelagert werden.

*Die in Klammern angegebenen Werte beziehen sich auf die Durchführung einer Midipräparation, Qiagen-tip 100.

3.7.3 Isolierung chromosomaler DNA (großer Maßstab)

Für die Isolierung chromosomaler Gesamt-DNA werden 10 *Legionella*-Agarplatten mit je 1 ml H₂O_{bidest.} abgeschwemmt, die Fraktionen auf zwei JA 20 Zentrifugenröhrchen verteilt und abzentrifugiert. Das Pellet wird in 4 ml 0.15 M NaCl/ 0.1 M EDTA (pH 8.0) gewaschen und erneut abzentrifugiert. Anschließend wird das Pellet in 2 ml Lsg. B aufgenommen mit 0.6 ml 250 mM EDTA und 0.40 ml Lysozymlösung versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Um die Zellen zu lysieren, werden 0.40 ml 250 mM EDTA und 0.50 ml 10 % SDS zugegeben, für 15 min bei RT geschüttelt und durch Zugabe von TES Puffer ein Gesamtvolumen von 10 ml eingestellt. Nach Zugabe von 60 µl Proteinase K wird für 1 h bei 37°C geschüttelt, anschließend werden 2.5 ml 5 M NaClO₄ und 1 Vol Chloroform/Isoamylalkohol und zugegeben und in Schräglage für weitere 2 h geschüttelt (rpm 250). Nun kann die Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender DNA-Fällung durchgeführt und das Pellet in 1-2 ml H₂O_{bidest.} aufgenommen werden.

Lösungen:

<u>Lösung A:</u>	NaCl	0.15 M
	EDTA (pH 8.0)	0.1 M
<u>Lösung B:</u>	Sacharose	20 %
	Tris-HCl	10 mM
<u>Tes-Puffer:</u>	Tris-HCl (pH 8.0)	30 mM
	EDTA (pH 8.0)	5 mM
	NaCl	50 mM
	EDTA (pH 8.0)	250 mM
	SDS	10 %
	Proteinase K	10 mg/ml
	NaClO ₄	5 M

3.7.4 Phenol/Chloroform-Extraktion

Mittels dieser Methode können Proteine aus DNA-Lösungen entfernt bzw. Enzyme inaktiviert werden. Der DNA-Lösung wird mit 1 VT zuvor gemischtem Phenol/Chloroform versetzt und kräftig geschüttelt, bis eine homogene weiße Phase entsteht. Nach Zentrifugation trennt sich die wässrige von der organischen Phase und in der Interphase befinden sich die Proteine. Um die Reinheit zu erhöhen kann diese Prozedur solange wiederholt werden, bis sich keine Interphase mehr bildet, d.h. keine kotaminierenden Proteine mehr vorhanden sind. Abschließend werden Phenolreste durch einmaliges Waschen mit Chloroform entfernt. Die wässrige Phase enthält die DNA und kann nun vorsichtig abgenommen und nachfolgend gefällt werden.

Lösungen: Phenol equilibriert
Chloroform/Isoamlyalkohol (24:1)

3.7.5 Ethanolfällung von DNA

Zur Konzentration und Erhöhung der Reinheit von DNA wird diese mit 1/10 Vol % 3 M NaAc (pH 4.8) und 2 Vol % 100 % Ethanol versetzt. Der Ansatz wird dann für mindestens 15 min oder ÜN bei -70°C gelagert. Anschließend erfolgt die Sedimentation der gefällten DNA für 30 min (13000 rpm) in einer Tischzentrifuge. Das Pellet wird zur Entfernung von Salzen final mit 70 % Ethanol gewaschen und in einer „speed-vac“ Zentrifuge für ca. 10 min getrocknet. Danach kann das DNA-Pellet zur Analyse in kleinen Volumina TE-Puffer oder H₂O bidest. aufgenommen werden.

3.7.6 Bestimmung der DNA-Konzentration und des Reinheitsgehalts

DNA besitzt ein Absorptionsmaximum bei 260 nm. Zur Bestimmung des DNA-Gehalts einer Probe wird diese in einem Spektralphotometer gegen einen Nullwert (A. bidest.) gemessen. Die Messung erfolgt in 1 ml Quarzküvetten und die Extinktion wird bei 260 nm bestimmt. Eine OD von 1 entspricht ca. 50 µg/ml ds-DNA, ca. 40 µg/ml RNA bzw. 33 µg/ml einzelsträngiger Oligonukleotide. Zur Bestimmung des Reinheitsgehalts einer Probe wird diese zusätzlich bei 280 nm vermessen, einem Absorptionsmaximum von Proteinen. Aus dem Quotienten $OD_{260}/280$ können Aussagen über die Reinheit einer DNA-Probe gemacht werden. Werte für eine reine Präparation liegen zwischen 1.8-2.0.

3.7.7 Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur Charakterisierung von Plasmid- bzw. chromosomaler-DNA wird diese durch Restriktionsendonukleasen in spezifische Fragmente gespalten. Diese Enzyme erkennen innerhalb beider Stränge eines DNA-Moleküls spezifische palindrome Sequenzen, in denen sie schneiden. Dabei entstehen entweder stumpfe (blunt ends) oder einander komplementäre 5´ bzw. 3´-überhängende Enden (sticky ends). Die eingesetzten Mengen an DNA variieren entsprechend den nachfolgenden Applikationen.

<u>Zusammensetzung des Spaltansatzes:</u>	X µl DNA-Lösung (Plasmid bzw. Gesamt-DNA)
	1/10 VT Puffer
	1/10 VT RNase-Lsg. (10 mg/ml)
	1-5 U Restriktionsenzym

Für kleine Agarosegele wurden Ansätze von 50 µl Gesamtvolumen bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur für 1-2 h, bei chromosomaler DNA ÜN, inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wird die Reaktion durch die Zugabe von 1/10 VT Farbmarder abgestoppt.

3.7.8 Agarose-Gelelektrophorese

Aufgrund der negativen Ladung des Zucker-Phosphat-Rückgrats von DNA-Molekülen wandern diese einem elektrischen Feld ausgesetzt, zur Anode. Die Mobilität von linearen DNA-Fragmenten ist innerhalb bestimmter Größenbereiche dem Logarithmus ihres Molekulargewichts proportional (Sambrook *et al.*, 1989). Zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten können diese in einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt werden.

Lösungen:

<u>TAE-Puffer 10 x konz.:</u>	Tris	1540 g
	Borsäure	26.2 g
	EDTA	9 g
	H ₂ O <small>bidest.</small>	ad. 1000 ml
<u>Agarosegel:</u>	Agarose	0.7-1.2 % (w/v)
	TAE-Puffer 1 x	1 VT
<u>Farbmarker 10 x konz.:</u>	Bromphenolblau	0.25 % (w/v)
	Xylencyanol	0.25 % (w/v)
	Ficoll 400	1.5 % (w/v)
	H ₂ O <small>bidest.</small>	
<u>Ethidiumbromid-Stammlsg.:</u>		10 mg/ml

Es werden horizontale Agarose-Gele verschiedener Größe hergestellt. Der prozentuale Anteil an Agarose richtet sich nach den Größen der aufzutrennenden DNA-Fragmente. Die zuvor in TAE-Puffer gegebene Agarose wird aufgeköcht und so gelöst. Nach erfolgter Abkühlung (ca. 50°C) in eine Plexiglaswanne gegossen, in die zuvor ein Probenkamm eingesetzt wurde. Nach Erstarren des Agarosegels wird dieses in eine Elektrophorese-Apparatur eingesetzt und mit 1 x konz. TAE-Puffer überschichtet. Die zuvor mit 1/10 Vol % „Loading“-Puffer (=Farbmarker) versetzten DNA-Proben werden in die ausgesparten Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 80-100 V für ca. 1 h (vorwiegend Plasmid-DNA) oder bei 35 Volt über 16 h (Gesamt-DNA). Anschließend werden die Gele für 10-15 min in Ethidiumbromidbad (0.5 µg/ml) gefärbt. Die aufgetrennte DNA kann auf einem UV-Transilluminator durch Bestrahlung bei einer Wellenlänge von 312 nm sichtbar gemacht. Zur Dokumentation können die Gele digitalisiert und analysiert werden.

3.7.9 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen mit dem Gene-clean-Kit

Die gewünschten Ethidiumbromid gefärbten DNA-Banden werden unter UV-Bestrahlung aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Cup überführt. Zu den Gelstücken werden jeweils ca. 3 VT NaI-Puffer gegeben und die Agarose-Stücke bei 54°C aufgelöst. Nach erfolgter vollständiger Auflösung wird die DNA-haltige Lösung mit 5-10 µl Glasmilch versehen und für 5 min bei RT inkubiert und alle zwei Minuten durchmischt. Danach wird für 15 sec mit „full speed“ in einer Tischzentrifuge sedimentiert und das Glasmilch-Pellet 3 mal mit 200 µl Waschpuffer (NewWash) gewaschen. Durch Zugabe von 5-10 µl H₂O bidest. und Inkubation bei

54°C kann die DNA durch Zentrifugation (1 min, 14000 rpm, Tischzentrifuge) aus der Glasmilch eluiert werden.

3.7.10 Ankonzentrierung und Reinigung von DNA mit dem Gene-clean-Kit

Für die Verwendung von DNA in nachfolgenden Applikationen ist es wichtig, störende Komponenten auszuschließen und einen hohen Reinheitsgrad zu erzielen. Analog der oben beschriebenen Prozedur, ausgenommen der Inkubationschritte bei 54°C, kann aufgrund der hohen DNA-Bindungs Kapazität von Silicagel-Partikeln unter hohen Salzkonzentrationen, eine schnelle und unkomplizierte Aufreinigung der DNA aus wässrigen Lösungen durchgeführt werden.

Lösungen: Gene-clean, NaI-Puffer
Glasmilch
Waschpuffer
(NewWash)

3.7.11 Behandlung von Insert-DNA mit dem Klenow-Enzym

Das Klenow-Enzym stellt die große Untereinheit der DNA-Polymerase I dar. Im Gegensatz zum nativen Enzym fehlt dem Klenow-Enzym die 5'-3' Exonukleaseaktivität. Überstehende Einzelstrangenden (sticky-ends), die durch die Behandlung mit bestimmten Restriktionsendonukleasen entstehen, können durch das Klenow-Enzym unter Zugabe von dNTPs zu "glatten" Enden (blunt-ends) aufgefüllt werden. Durch das Fehlen der 5'-3'-Exonukleaseaktivität können nur Enden aufgefüllt werden, die ein überstehendes 5'-Ende aufweisen. Die entstandenen blunt-ends können anschließend z.B. in *SmaI*-/*EcoRV*-Schnittstellen, ebenfalls blunt-end-Schnittstellen, inkloniert werden. Die Klenow Behandlung kann meistens direkt nach Generierung der Schnittstellen im gleichen Puffersystem (hier One-Phor-all, Pharmacia) durchgeführt werden. Wichtigstes Kriterium ist die Anwesenheit von MgCl₂-Ionen. Nach Zugabe des dNTP-Mix und 1-2 U Klenow-Enzym wird für 30 min bei 37°C inkubiert.

Reaktionsansatz:

dNTP-Mix	0.5 mM	dATP
	0.5 mM	dTTP
	0.5 mM	dGTP
	0.5 mM	dCTP
Klenowpuffer (10 x)	1 VT	
Klenow-Enzym	1-2 units	

Nach erfolgter Inkubation kann das Enzym durch 10-minütiges Erhitzen auf 75°C inaktiviert werden. Empfehlenswert kann auch die Aufreinigung über ein Agarosegel oder die Fällung mit vorausgegangener Phenolisierung sein. Die aufgefüllten DNA-Fragmente können nun in einer blunt-end Ligation eingesetzt werden.

3.7.12 Behandlung von DNA mit der T4-Polymerase

Im Gegensatz zu dem Klenow-Fragment besitzt die T4-DNA-Polymerase neben der 5'-3'-Polymeraseaktivität auch eine starke 3'-5'-Exonukleaseaktivität (proofreading-activity). Die Anwesenheit von dNTP's inhibiert die 3'-5'-Exonukleaseaktivität, die Degradation von einzel- und doppelsträngiger DNA von freien 3'-Hydroxyl-Enden aus, womit die 5'-3'-Polymeraseaktivität überwiegt. Dies macht man sich zu nutze, um überhängende freie 3'-Enden, die nicht mit der Klenow-Polymerase aufgefüllt werden können, abzubauen. Auch hier werden glatte sogenannte blunt-ends generiert. Zu dem gereinigten PCR-Fragment oder der Plasmid-DNA (ca. 100 ng) wird folgender Reaktionsansatz zugegeben, das Gesamtvolumen beträgt 50 µl.

Reaktionsansatz:

dNTP-Mix	0.5 mM	dATP
	0.5 mM	dTTP
	0.5 mM	dGTP
	0.5 mM	dCTP
ATP	5 mM	
10 x PNK-Puffer		
T4-DNA-Polymerase	5 units	
T4-Polynukleotide-Kinase	10 units	

Der DNA-haltige Ansatz wird nun für 60 min bei 37°C inkubiert. Vor dem Einsatz in die Ligation werden die Enzyme entweder Hitze-inaktiviert oder durch eine sich anschließende Aufreinigung (Chloroform/Phenol-Behandlung mit anschließender Fällung, oder Gelaufreinigung) entfernt.

3.7.13 Alkalische Phosphatase-Behandlung

Die Alkalische Phosphatase (AP) katalysiert die Entfernung von Phosphatresten sowohl an 5'- als auch an 3'-DNA-Enden. Die Dephosphorylierung wird für die Ligation von blunt-end Fragmenten eingesetzt, um eine mögliche Selbstzirkulation der Vektor-DNA weitgehend zu unterbinden. Die mit blunt-end generierenden Enzymen aufgeschnittene Vektor-DNA wurde anschließend durch Zugabe von Alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Zuvor wird der Ansatz (beinhaltet Restriktionsenzyme) Hitze-inaktiviert. Der Ansatz wird auf ein

Gesamtvolumen von 50 µl eingestellt und unter Zugabe von 10 x One-Phor-All-Plus Puffer eine 1 x Pufferkonzentration hergestellt. Nach Zugabe von 0.1-1 Unit AP wird der Reaktionsansatz für 30 min bei 37°C inkubiert. Vor der Weiterverwendung muss die AP durch Hitze (15 min, 85°C) oder über Gelaufreinigung deaktiviert werden, um in nachfolgenden Applikationen die Degradation von freien Phosphatengruppen zu verhindern.

3.7.14 Ligation von Vektor- und Insert-DNA

Die aus mit dem Phagen T4 infizierten *E. coli* Zellen gewonnene T4-Ligase katalysiert die Ausbildung von Phosphodiester-Bindungen zwischen der 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppe eines DNA-Moleküls. Das Enzym ist in der Lage, sowohl sticky- als auch blunt-ends zu ligieren. Um die intramolekulare Selbstzirkulation des Vektors zu verringern, wurde die Gesamtkonzentration an freien Enden erhöht, um so die intermolekulare Zirkularisierung zu begünstigen, d.h. die Insert-DNA wurde in 2-3 fachem molaren Überschuss eingesetzt. Für die Ligation werden Vektor-DNA und Fragment-DNA entweder mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten oder eines der beiden Fragmente mit blunt-end generierenden Enzymen behandelt. In diesem Fall müssen die sticky-ends entweder wie unter (vgl. 3.7.11) beschrieben mit Klenow-Enzym oder mit T4-DNA-Polymerase (vgl. 3.7.12) behandelt werden. Bei blunt-end Ligation empfiehlt sich die Dephosphorylierung der Vektor-DNA wie unter (vgl. 3.7.13) beschrieben. Entsprechende Volumina von Vektor und Fragment-DNA werden gemischt, dem Ansatz werden 4 µl 5 x Ligasepuffer, 1 µl T4-Ligase und die entsprechenden Menge H₂O_{bidest.} zugegeben, so dass ein Gesamtvolumen von 20 µl nicht überschritten wird. Inkubiert wird ÜN bei 14°C im Wasserbad.

Lösungen: T4-Ligase (1 U/µl, Gibco)
5 x- T4-Ligasepuffer (Gibco)

3.7.15 Klonierungs-Kits

Das „SureClone®“ Ligations-Kit ermöglicht eine schnelle und effiziente Klonierung von PCR-Fragmenten in den Vektor pUC18. Hierbei wurden die Adeninnukleotide an den 3' Enden der generierten PCR-Fragmente durch Einsatz von Klenow-Enzym aufgefüllt, durch Polynukleotide Kinase phosphoryliert und konnten direkt in den im Kit enthaltenen, blunt end aufgeschnittenen und dephosphorylierten Vektor pUC18 einkloniert werden. Die genaue Anleitung ist dem Kit zu entnehmen.

Das pGEM[®] T Easy Vektor-System verwendet die von bestimmten Taq-Polymerasen generierten Adenosin 3' Enden an den PCR-Fragmenten zur effizienten Ligation, indem der linearisierte Vektor mit 3' Thymin-Enden versehen wird. Der pGEM[®] T Easy Vektor besitzt T7 und SP6 RNA-Polymerase-Promotoren und eine multiple cloning site mit einer für das α -Peptide kodierenden Region, die bei Insertion von Fremd-DNA eine Selektion mittels β -Galactosidase auf entsprechenden Selektivplatten erlaubt. Beide vorgestellten Vektor-Systeme ermöglichen das Screening auf Insert-tragende Kolonien mittels blau-weiss Selektion auf LB-X-Gal/ Ampicillin Agarplatten.

3.7.16 PCR Reaktion (Polymerase chain reaction)

Die PCR-Methode findet für die Erzeugung und Identifikation spezifischer DNA Fragmente Verwendung. Hierbei werden die thermostabilen Eigenschaften der Taq-Polymerase, ursprünglich isoliert aus dem Archaeobakterium *Thermophilus aquaticus*, benutzt, um zwischen zwei Oligonukleotidprimern liegende DNA-Abschnitte zu amplifizieren. Prinzipiell wird die zu amplifizierende DNA in einem ersten Schritt denaturiert, so dass sie als Einzelstrang-DNA vorliegt, nachfolgend kommt es zur sequenzspezifischen Hybridisierung der Oligonukleotidprimer und im folgenden zur Polymerisation (Elongation) der entsprechenden DNA-Abschnitte. Die Einzelschritte der Amplifikation sind durch spezifische Temperaturen und Zeiten gekennzeichnet und werden in bis zu 40 aufeinanderfolgenden Zyklen wiederholt. Die erfolgreiche DNA-Amplifikation kann im Agarosegel analysiert werden. Im Denaturierungsschritt werden Temperaturen zwischen 94-98°C verwendet, die Anlagerungstemperatur (T_m) der Primer wird nach der unten angegebenen Formel berechnet und die Dauer des Polymerisationschrittes (68-72°C) richtet sich nach dem verwendeten Polymerasetyp und der Länge der zu amplifizierenden DNA-Abschnitte.

$$T_m^{\circ}\text{C} = 69.3^{\circ}\text{C} + 0.41 \times (\% \text{ GC-Gehalt}) - 650 / \text{Primerlänge}$$

$$T_a = T_m + 3^{\circ}\text{C}$$

Standard-PCR Ansatz:

10 x PCR-Puffer	x μ l
MgCl ₂	25 mM
dNTP	20 mM
Primer A	100 pmol
Primer B	100 pmol
Template DNA	10-1000 ng
Polymerase	1-5 U
H ₂ O bidest.	x μ l

Bei Verwendung des PCR Reagenz „Supermix“ (Gibco) werden nur noch die Primer und das Template hinzugegeben, alle anderen Komponenten sind in optimalen Konzentrationen enthalten.

3.7.17 “Site-spezifische” Mutagenese mittels PCR

Die Methode der site-spezifischen Mutagenese mit Hilfe der PCR ermöglicht die gezielte Veränderung bestimmter DNA-Sequenzen innerhalb eines Gens. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode verwendet, um das *Legionella* Mip-Protein durch den gezielten Austausch bestimmter Aminosäuren in Hinblick einer Funktionsanalyse zu untersuchen. Zur Erzeugung site-spezifisch veränderter Mip-Proteine finden 2 unterschiedliche Vorgehensweisen Verwendung.

Amplifikation eines gesamten Plasmids: Hierbei werden 2 Mutagenese-Primer (A u B, vgl. Abb. 4) verwendet, die mit ihren 5'-Enden direkt aneinanderstoßen und eine Amplifikation der einzelnen Stränge (+, -) des Plasmids in entgegengesetzter Richtung ermöglichen. Die verwendeten Mutagenese-Primer müssen an ihren 5' Enden phosphoryliert (P) sein. Die Amplifikation sollte mittels der *Pfu*-Polymerase durchgeführt werden, da diese keine Adenylyltransferase-Aktivität besitzt, welche sonst zur Erzeugung von 3' Nukleotid-Überhängen führen und die nachfolgende Ligation stören würde. Nach Amplifikation wird der Ansatz im Agarosegel aufgetrennt, die entsprechenden Bande ausgeschnitten, mittels GeneClean aufgereinigt und ÜN ligiert. Die Ligationsansätze werden in *E. coli* DH5 α transformiert und die erhaltenen Klone auf Mip-Expression im Immunokolonieblot hin untersucht. Bei den so erzeugten mutagenisierten Mip-Proteinen muss durch Sequenzierung der Mutagenesestelle der Austausch der entsprechenden Aminosäuren verifiziert werden. Die PCR-Bedingungen werden wie folgt gewählt:

Segment	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	94-98°C	45 sec
2	25-30	94-98°C	45 sec
		Primer T _m - 5°C	45 sec
		72°C	2 min/kb Produkt
3	1	72°C	10 min

Als Template wurden 10-100 ng des Plasmids pRK31 eingesetzt, 100 pmol Primer und je 25 mM dNTP's, sowie 10 μ l 10 x cloned *Pfu* reaction buffer, 5 U cloned *Pfu*-Polymerase und mit H₂O_{bidest.} auf ein Gesamtvolumen von 100 μ l aufgefüllt.

Teilamplifikation mit nachfolgender Ligation: Hierbei wird das zu mutagenisierende Gen in zwei Fragmenten amplifiziert, ligiert und mit genspezifischen 5´ und 3´ Primern unter Verwendung des Ligationsansatzes als Template in einer erneuten PCR Reaktion angereichert. Die PCR Produkte werden im Agarosegel aufgetrennt und die Bande mit der entsprechenden Größe ausgeschnitten, eluiert und in pGEM[®] T Easy Vektor ligiert. Das Screening auf Mip-Expression erfolgt nach der oben beschriebenen Vorgehensweise (Immunokolonieblot). Auch hier wird die Richtigkeit des Aminosäureaustausches mittels Sequenzierung bestätigt. In diesem Ansatz werden ebenfalls am 5´ Ende phosphorylierte Primer und neben der *Pfu*-Polymerase, Dap Polymerase bzw. ElongaseMix verwendet und in gleichen Konzentrationen wie vorher beschrieben eingesetzt.

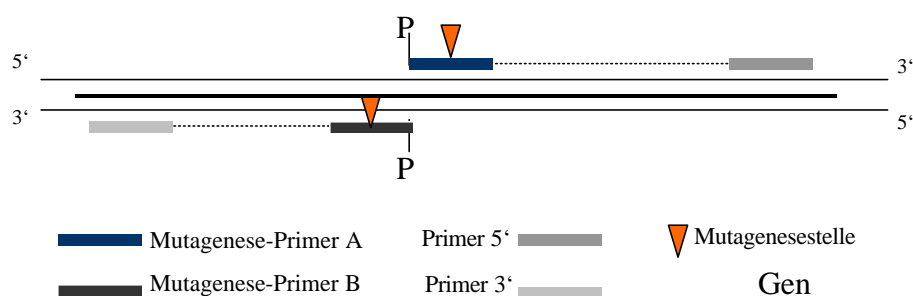


Abb.4): Site-spezifische Mutagenese mit Hilfe der PCR. Unter Verwendung zweier Mutagenese-Primer wird das gesamte Plasmid amplifiziert oder durch Verwendung weiterer Primer einzelne Fragmente amplifiziert.

3.7.18 DNA-Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten Primern

Die DNA-Sequenzierung wird nach dem Prinzip von Sanger *et al.*, 1977 mittels des Didesoxy-Ketten/Abbruchverfahrens in einem automatischen Sequenzer von Licor (DNA Sequencer 4000) durchgeführt. Hierzu werden fluoreszenzmarkierte Primer (IRD-800) verwendet. Zur Durchführung der Sequenzierreaktion wird das “Thermo Sequenase[™] fluorescence labelled primer sequencing kit” benötigt. Die einzusetzende DNA-Menge richtet sich nach der Reinheit der Präparation. In erster Näherung kann mit 100 ng/kB Template DNA begonnen werden. Dazu wird die entsprechende Menge DNA (max. 12 µl) mit 50-100 pmol IRD-800 markiertem Primer gemischt und auf ein Volumen von 13 µl gebracht. Von diesem DNA/Primer-premix werden jeweils 3 µl auf vier 0.5 ml Eppendorfgefäße verteilt, in die zuvor schon jeweils 1 µl Terminationsmix (A, C, G, T) vorpipettiert wird. Dieser enthält neben den 4 dNTPs (Desoxynukleosidtriphosphat) auch die Didesoxynukleotide (ddNTPs), die beim Einbau zum Kettenabbruch führen. Es wird kurz zentrifugiert und mit leichtem Mineralöl überschichtet. Die Amplifikation erfolgt in einem “Eppendorf” oder “Techne” Thermocycler. Initial wird ein 2-minütiger Denaturierungsschritt (94°C) durchgeführt, gefolgt von 30 Zyklen Denaturierung,

Primer Annealing (T_a °C; vgl. 3.7.16) und Polymerisationsschritten. Die anschließende PCR im Thermocycler durchläuft folgende Zyklen:

1 Zyklus: 95°C/ 2 min

30 Zyklen: 95°C/ 30 sec, T_a °C/ 30 sec , 70°C/ 30 sec

A, C, G, T-Reagenz: Tris-HCl, pH 9.5; MgCl₂; Tween 20; Nonidet P-40; 2-Mercaptoethanol; dATP; dCTP; 7-deaza-dGTP; dTTP; thermostabile Pyrophosphatase; Thermosequenase; DNA Polymerase sowie das entsprechende Didesoxynukleosid (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP).

Nach Beendigung wird dem Reaktionsgemisch jeweils 3 µl Stopppuffer zugegeben und pro Reaktion 1-2 µl auf ein Sequenziergel aufgetragen. Die Sequenziergebnisse können dann mittels eines Lasers und spezieller Software ausgewertet werden. Homologievergleiche erfolgten über BLAST-search direkt im Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

3.8 Transformation

3.8.1 Herstellung kompetenter *E. coli*

Für die Transformation von Fremd-DNA in *E. coli* K-12 werden Zellen benötigt, die sich im natürlichen Kompetenzstadium befinden. Um dies zu erreichen, bedient man sich der CaCl₂-Methode und geht wie folgt vor. Eine ÜN-Kultur wird 1:50 verdünnt und bis zu einer OD von 0.6-0.7 bei 37°C im Inkubationsschüttler angezogen. Ca. 45 ml dieser logarithmisch wachsenden Kultur werden für 10 min bei 4000 rpm in einer Kühlzentrifuge pelletiert. Anschließend wird das Pellet in 10 ml der eiskalten 100 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach diesem Waschschrift werden die Zellen wiederum in 10 ml der 100 mM CaCl₂-Lösung aufgenommen und für ca. 30 min auf Eis gehalten. Während dieser Inkubation erreichen die Zellen das Stadium der Kompetenz und werden nach erneuter Zentrifugation (10 min, 4000 rpm) in 2 ml CaCl₂-Lösung aufgenommen. Die Zellen können nun entweder direkt verwendet oder mit Glycerin versetzt (Endkonz. 25%) in Aliquots von jeweils 150 µl bei -70°C gelagert werden.

Lösung: 100 mM eiskaltes, steriles CaCl₂

3.8.2 Heat-shock-Transformation von *E. coli*

Die *E. coli* K-12 Zellen werden, wenn sie bei -70°C gelagert wurden, schonend auf Eis aufgetaut und zusammen mit der zu transformierenden DNA (Ligationsansatz etc.) für 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgt eine 90 sec lange Inkubation bei 42°C. Nachfolgend werden die Zellen

noch einmal kurz auf Eis gestellt. Anschließend wird der Transformationsansatz in 1 ml LB-Medium aufgenommen und für 1-2 h (1-2 Generationen) bei 37°C geschüttelt. Die Ansätze werden dann auf Selektionsplatten ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert.

3.8.3 Elektroporation von *L. pneumophila*

Eine Methode der Transformation von Legionellen ist die Elektroporation. Hierbei werden die Bakterien kurzzeitig einem elektrischen Puls hoher Feldstärke ausgesetzt, wodurch sich die Permeabilität der Zellmembran vorübergehend erhöht und so hochmolekulare Substanzen (z.B. DNA) über die Membran aufgenommen werden können. Zur Vermeidung von Kurzschlüssen während der Elektroporation ist es wichtig, in nichtionischen Puffern mit geringer Leitfähigkeit zu arbeiten.

Lösungen: 10 % eiskaltes, steriles Glycerin

Für die Anzucht der Rezipientenzellen (*Legionella*) werden diese auf einer BCYE-Agarplatte ausgestrichen und 24-48 h im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nachfolgend wird der Bakterienrasen mit sterilem 10 % Glycerin abgeschwämmt, die OD auf 0.6 bis 0.8 eingestellt und die Zellen mehrmals gewaschen. Dazu werden die Zellen in 50 ml Greiner-Röhrchen überführt und bei 4000 rpm und 4°C für 15 min abzentrifugiert. In einem ersten Zentrifugationsschritt wird das Volumen um 50 % reduziert. Nachfolgend wird auf 10 % des Ausgangsvolumens reduziert und zuletzt werden die Zellen in 200 µl 10 % Glycerin aufgenommen und in Aliquots von 40 µl bei -70°C gelagert. Für die Elektroporation werden 40 µl dieser Zellen mit 1-20 µl DNA (ca. 200 ng- 1 µg) in auf 4°C temperierte Elektroporationsküvetten pipettiert und in der Elektroporation eingesetzt. Als Kontrolle wird ein Ansatz ohne DNA mitgeführt. Die Elektroporation wird unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Gene Pulser:	2.3 kV(Feldstärke 12.5 kV/cm)
	25 µFD Kapazität
Pulse Controller:	100 Ω Widerstand
Zeitkonstante:	2.0-2.5 msec
Elektrodenabstand:	0.2 cm

Nach erfolgter Elektroporation werden die Zellen in 1 ml AYE-Bouillon aufgenommen und für 4-6 h (1-2 Generationen) bei 37°C im Rotationsschüttler inkubiert. Anschließend werden die Ansätze auf ABCYE Selektionsplatten ausplattiert und für 4-10 Tage bei 37°C und 5 % CO₂

inkubiert. Erhaltene Klone werden zur weiteren Analyse vereinzelt und auf frischen ABCYE-Selektionsplatten ausgestrichen.

3.9 Proteinbiochemische Methoden

3.9.1 Molekulargewichtsbestimmung mittels SDS-PAGE

Die Molekulargewichtsbestimmung (M_r) von Proteinen wird mit einer diskontinuierlichen vertikale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) durchgeführt. Durch die Zugabe von SDS werden die Proteine denaturiert. Die SDS-Anionen binden in konstanten Gewichtsverhältnissen an die Aminosäurereste, so dass ein Komplex aus SDS und denaturiertem Protein entsteht, dessen negative Ladung der Masse des Proteins proportional ist. Der negative SDS-Proteinkomplex wandert im Gel zur Anode, wobei kleinere Proteine eine höhere elektrophoretische Beweglichkeit aufweisen und schneller durch eine bestimmte Gelstrecke wandern. Die später ermittelten Molekulargewichte beziehen sich auf die Proteinmonomere, unter reduzierenden Bedingungen.

Lösungen:

<u>-Acrylamid-Stammlösung:</u>	(30 %, w/v):Acrylamid	30 %
	N, N-Methylen-bis-Acrylamid	0.8 %
<u>-SDS-Trenngelpuffer:</u> (10 x konz., pH 8.8)	Tris/HCl	1.5 M
	Natriumdodecylsulfat (SDS)	0.4 % (w/v)
<u>-SDS-Sammelgel-Puffer:</u> (10 x konz., pH 6.8)	Tris/HCl	0.5 M
	Natriumdodecylsulfat (SDS)	0.4 % (w/v)
<u>-SDS-Laufpuffer (10 x konz.):</u>	Tris/HCl	0.5 M
	Glycin	3.84 M
	SDS	0.1 % (w/v)
<u>-SDS-Probenpuffer:</u> (4 x konz., pH 6.8)	Tris/HCl	0.25 M
	SDS	0.8 % (w/v)
	Glycerin	40 % (w/v)
	â-Mercaptoethanol (14 M)	10 % (v/v)
	EDTA	4 mM
	Bromphenolblau	0.01 % (w/v)
-Isopropanol (100 %)		
-TEMED		
-APS (10 %, w/v)		

Die Elektrophoreseapparatur wird entsprechend den Herstellerangaben vorbereitet und zusammengesetzt. Dazu werden die Glasplatten mit 100% EtOH gereinigt und mit Spacern versehen zusammengebaut. Nun wird die Trenngellösung bis ca. 1.5-3 cm unter die obere Glaskante eingefüllt und zur Bildung einer scharfen Oberfläche mit Isopropanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation (ca. 30 min) wird das Isopropanol mittels Wasser und Whatmanpapieren abgenommen und die Sammelgellösung zwischen die Glasplatten eingefüllt. Beim Einsetzen der Kämme ist darauf zu achten, dass es keinen Luftblaseneinschluss gibt, der den Lauf der Proteine beeinträchtigen könnte. Nach vollständiger Polymerisation der Gele werden diese nun in die Elektrophoresekammer eingesetzt und die Pufferreservoirs mit SDS-Laufpuffer befüllt. Vor dem Probenauftrag empfiehlt es sich, die Probenslots durch Spülen mit Elektrophoresepuffer mittels einer Spritze von Polyacrylamid-Resten zu befreien. Nach dem Probenauftrag erfolgt der Elektrophoreselauf bei 25 mA pro Gel für ca. 1 h. Nach Austritt der Bromphenolblau-Front aus der unteren Gelkante kann der Lauf beendet und das Gel nachfolgend in Coomassie-Blue oder Silbernitrat gefärbt oder für einen Westernblot verwendet werden.

3.9.2 Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen

Die Färbung und Fixierung der PAA-Gele erfolgt unter leichtem Schwenken (40 rpm) in Coomassie-Blue. Die Färbung kann entweder für 1-2 h oder ÜN bei RT durchgeführt werden. Die sich anschließende Entfärbung wird durch Zugabe von Entfärberlsg., die mehrmals gewechselt wird, erreicht. Nach vollständiger Hintergrund-Entfärbung können die Gele entweder in H₂O oder zwischen Whatmanpapier und Folie eingelegt auf den Geldryer für ca. 2 h bei 70°C getrocknet werden.

Lösungen:

<u>Färbelösung:</u>	454 ml	Methanol/Ethanol*
	92 ml	100 % Essigsäure
	2.5 g	<u>Coomassie Blue R-250</u>
		ad. 1 l H ₂ O _{bidest.}

<u>Entfärbelösung:</u>	75 ml	100 % Essigsäure
	50 ml	<u>Methanol/Ethanol*</u>
		ad. 1 l H ₂ O _{bidest.}

*aufgrund der Toxizität von Methanol kann auch Ethanol verwendet werden.

3.9.3 Silberfärbung

Nachdem das Gel aus den Glasplatten heraus gelöst wurde, wird unter leichtem Schwenken für 30 min oder länger in Fixierlösung inkubiert. Anschließend wird 3 mal mit 50 % igen Ethanol

für jeweils 20 min gewaschen. Nun wird das Gel für 1 min mit Natriumthiosulfat überschichtet und anschließend 2 mal für 20 sec mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gespült. Die nachfolgende Inkubation in Silbernitrat erfolgt für 20 min, abschließend wird 2 mal (20 sec) mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gewaschen und die Proteinbanden unter Zusatz von Entwicklerlsg. entwickelt. Nach Färbung wird unter Zusatz von 1 % Glycin abgestoppt und die Gele in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gelagert oder mittels Geldryer getrocknet und so aufbewahrt. Um Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, sollten die Inkubationszeiten genau eingehalten werden.

Lösungen:

<u>Fixierlösung:</u>	300 ml	Methanol
ad. 1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$	100 ml	100 % Essigsäure
<u>Waschlösung:</u>	50 %	Ethanol / $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$
<u>Inkubationslösung:</u>	0.02 %	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$
<u>Imprägnierlösung:</u>	0.5 g	AgNO_3
ad. 250 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$	50 μl	Formaldehyd
<u>Entwicklerlösung:</u>	5 g	Na_2CO_3 (H_2O frei)
ad. 200 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$	0.01 %	HCHO Formaldehyd (37 %)
<u>Stopplösung:</u>	1 %	Glycin

3.9.4 Protein-Transfer auf Nitrozellulosemembran (Westernblot)

Durch das Westernblot-Verfahren können Proteine mittels elektrophoretischen Transfers auf Nitrozellulose oder PVDF-Membran immobilisiert und dadurch einer Analyse zugänglich gemacht werden. Dazu wird ein halbtrockenes Blot-Verfahren unter Verwendung mehrerer Puffer und einem „Sandwich“-Aufbau von Whatman-Filterpapieren, Membran und Gel eingesetzt.

Lösungen:

<u>Anodenpuffer I:</u>	0.3 M	Tris-Base
	20 %	Methanol
<u>Anodenpuffer II:</u>	0.025 M	Tris-Base
	20 %	Methanol
<u>Kathodenpuffer:</u>	0.025 M	Tris-Base
	0.04 M	ϵ -Amino-n-Caprinsäure
	20 %	Methanol

Nachdem das Gel aus den Glasplatten herausgelöst wurde, kann das Sammelgel mit einem Skalpell abgeschnitten werden. Jetzt werden die Membran und die 12 Whatman-Papiere auf

exakt die gleiche Größe zugeschnitten wie das Gel. Die Graphit-Elektroden der Blotapparatur werden mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ befeuchtet und zuerst 6 Whatman-Filterpapiere in Anodenpuffer I getränkt und dann luftblasenfrei aufgelegt. Anschließend legt man 3 in Anodenpuffer II getränkte Filterpapiere auf und die ebenso behandelte Nitrozellulosemembran. Bei Verwendung von PVDF-Membranen muss diese zuerst für 30 sec in 100 % Methanol gelegt und dann für 5 min im entsprechenden Transferpuffer equilibriert werden. Auf die Membran kommt das Gel zu liegen und in einem letzten Schritt werden noch einmal 3 in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere aufgelegt. Die Blotkammer wird durch auflegen der Kathoden-Graphitplatte geschlossen und für 1 h bei 0.8 mA/cm^2 Gel geblottet. Die Effizienz der Übertragung kann durch Verwendung von vorgefärbten Markerproteinen eingeschätzt werden.

3.9.5 Transfer von Gesamtzellproteinen auf Nitrozellulose (Immunokolonieblot)

Für den Nachweis der Proteinexpression einzelner Klone innerhalb einer großen Gesamtheit an Einzelkolonien ist der Immunokolonieblot die Methode der Wahl. Gesamtzellproteine ganzer Kolonien werden an Nitrozellulose gebunden und können nachfolgend mittels Antigen-Antikörper-Reaktion spezifisch detektiert werden. Membranstücke geeigneter Größe werden steril auf entsprechende Agarplatten aufgelegt und die zu untersuchenden Bakterien ausgestrichen und bebrütet. Nach Erreichen einer ausreichenden Koloniegröße werden die Membranen auf 10 % TCA haltige Filterpapiere (Bakterie nach oben) gelegt und für 30 min bei 4°C behalten. Hierbei werden die Zellen lysiert und die Gesamtproteine gefällt und an der Membran fixiert. Anschließend neutralisiert man den pH durch 20 min Inkubation auf 1 M Tris/HCL (pH 7.5) getränktem Filterpapier und wäscht die Zellreste durch dreimaliges 10 minütiges Waschen in 1 x TBST ab. Die Filter sind nun für einen immunologischen Nachweis der Proteinexpression verwendbar.

Lösungen:

	10 %	Trichloressigsäure (TCA)
	1 M	Tris/HCl (pH 7.5)
<u>1 x TBST:</u>	50 mM	Tris/HCl (pH 7.5)
	150 mM	NaCl
	0.5 %	Tween 20

3.9.6 Detektion der Antigen-Antikörper Reaktion

Um eine unspezifische Bindung der Antikörper (AK) an die Nitrozellulose-Membran zu verhindern, müssen die noch freien Bindungsstellen zuerst blockiert werden. Dazu wird die

Membran für 1 h in TBST mit 1 % Milchpulver unter leichtem Schwenken bei RT aufbewahrt. Anschließend erfolgt die Antikörper-Zugabe, ebenfalls in 1 x TBST mit 1 % Milchpulver für 1-2 h bei RT. Die Verdünnung der Antikörper richtet sich nach dem jeweiligen Titer der Antikörperlösung und liegt zwischen 1:500 bis 1:5000. Nach erfolgter Inkubation wird der überschüssige AK durch 3 aufeinanderfolgende Waschstschritte mit 1 x TBST (3 x 5 min) entfernt und so die Membran für die Reaktion mit dem sekundären Antikörper (Verdünnung 1:1000), der gegen den Fc-Teil des primären Antikörper gerichtet ist, vorbereitet. Zur spezifischen Detektion sind die sekundären AK mit verschiedenen Enzymen (z.B. Peroxidase, Alkalische Phosphatase) gekoppelt, die die jeweilige Substratumsetzung katalysieren. Abschließend wird noch 3 mal für 10 min mit TBST gewaschen, um nicht gebundenen AK zu entfernen und wie unter (vgl. 3.10.3) beschrieben entwickelt.

3.9.7 Stripping von Blotmembranen

Eine bereits entwickelte Membran kann mehrmals für eine Antikörperreaktion und nachfolgende Detektion verwendet werden. Dazu muss der gebundene Antikörper von der Membran entfernt und die Membran neu blockiert werden. Hierzu wird der Blot für 30 min bei 50°C unter gelegentlichem Schwenken in Strip-Puffer inkubiert. Anschließend wird intensiv gewaschen (2 x 10 min in TBST) und erneut für mindestens 1 h blockiert.

Strip-Puffer: 100 mM 2-Mercaptoethanol
2 % SDS
62,5 mM Tris-HCl (pH 6.7)
Blocking Reagenz: 1 % Milchpulver in TBST

3.9.8 Anzucht von *E. coli* und die Induktion der Proteinbiosynthese

Eine *E. coli* Kultur wird in LB-Medium mit entsprechend selektivem Antibiotikum-Einsatz ÜN angezogen. Diese Vorkultur wird nun 1:100 mit frischem LB-Medium verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.6-0.9 bei 37°C im Rotationsschüttler (rpm 180-220) inkubiert. Haben die Bakterien die Zelldichte erreicht, induziert man unter Zugabe von sterilem IPTG (finale Konz. 1-2 mM) die Proteinbiosynthese und lässt die Kulturen noch 4-6 h weiter wachsen. Abschließend werden die Zellen bei 4000 rpm in JA10- Zentrifugenbechern pelletiert und entweder direkt für den Zellaufschluss vorbereitet oder trocken bei -20°C weggefroren. Für den Aufschluss werden die Zellen noch einmal gewaschen und dann in kleinen Volumina 10 mM Hepes-Puffer pH 7.5 aufgenommen.

3.9.9 French-press, Mechanische Lyse

Der Aufschluss mittels French-press erlaubt den Einsatz relativ großer Zellmengen und ermöglicht eine schonende Gewinnung von Gesamtzelllysaten. Dazu werden die Zellen wie unter 3.9.8 beschrieben angezogen und die Zellpellets in eiskaltem 10 mM Hepes-Puffer pH 7.5 aufgenommen. Die Suspension wird in den vorgekühlter Stahlzylinder der French-press eingesogen, das Auslassventil geschlossen und ein Druck von 1100 psi angelegt. Die Bakterien werden unter diesem Druck durch langsames Ventil-Öffnen herausgedrückt und dabei lysiert. Dieser Vorgang wird mehrmals wiederholt, bis eine Aufklärung des Lysats eintritt. Um die Proteaseaktivität gering zuhalten, sollten die Suspension ständig auf Eis gehalten werden. Für die weitere Analyse können die Zelltrümmer (10 min, 10000 rpm) abzentrifugiert (nicht bei der Präparation von Mip) und dann bei -70°C gelagert werden.

3.9.10 TCA-Fällung

Zur Fällung von Überstandsproteinen oder der Konzentrierung bzw. Verkleinerung von Volumina proteinhaltiger Lösungen wird die TCA-Fällung eingesetzt. Hierzu wird 1/10 VT 10 % TCA (Trichloressigsäure) zugegeben und für 30 min bei -20°C inkubiert. Die denaturierten Proteine werden durch Zentrifugation (13000 rpm, 30 min, 4°C) pelletiert. Nachfolgend wird der Überstand vorsichtig dekantiert und das Pellet zwei mal mit eiskaltem Aceton für 10 min gewaschen. Danach kann das Pellet luftgetrocknet und in SDS-Probenpuffer aufgenommen und analysiert werden.

3.9.11 Proteinaufreinigung von Mip

Die French-press-Lysate von 5 l *E. coli* DH5 α Zellen, die auf Plasmiden verschiedene site-spezifisch mutagenisierte Mip-Proteine exprimieren, werden unter Zusatz von 1 % Triton X-100 und 0.1 % Benzon-Nuklease (Merck) für 30 min bei 25°C inkubiert und anschließend das gleiche Volumen 2 mM Tricin-Puffer pH 8.5 zugegeben. Die folgenden Arbeitsschritte werden bei 4°C durchgeführt. Nach Zentrifugation (40 min, 70000g) wird der Überstand auf pH 8.5 eingestellt und auf eine mit 2 mM Tricin-Puffer pH 8.5 equilibrierte DEAE-Säule (2.6 x 20 cm, Merck) appliziert. Der Säulendurchfluss (einschließlich Mip) wird dann über 2 hintereinander geschaltete Säulen, zuerst über eine Fractogel TMAE und nachfolgend über eine Fractogel TSK-Blue-Säule gegeben, die mit dem gleichen Puffer equilibriert sind. Das an die Fractogel TSK-Blue-Säule gebundene Protein wird mittels 200 ml eines linearen 0 bis 2 M KCl Gradienten eluiert. Die Mip-enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und mit 35 % Amoniumsulfat unter Rühren für 30 min inkubiert und auf eine mit 35 % Amoniumsulfat und 2 mM Tricin-Puffer pH

8.5 equilibrierte Fractogel Propyl-Säule (1 x 15cm; Merck) aufgetragen. Gebundenes Protein wird dann mit 80 ml eines linearen Gradienten von 0 bis 35 % Ammoniumsulfat eluiert. Die Mip enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und gegen 2 x 3 l 2 mM Tricin Puffer, pH 8.5, dialysiert. Die Proteinlösung wird auf eine Fractogel TSK Green-Säule (1 x 7 cm; Merck) gegeben und mittels 80 ml eines linearen 0 bis 3 M KCl Gradienten eluiert. Die ersten Fraktionen des Gradienten enthalten homogen aufgereinigtes Mip-Protein.

3.9.12 Periplasma-Präparation von *E. coli* und *Legionella*

Zur Isolation von periplasmatisch lokalisierten Proteinen von *E. coli* und *Legionella* wird eine modifizierte Methode mittels osmotischen Schocks verwendet. *E. coli* Zellen werden bis zu einer OD₆₀₀ von 1 bei 37°C inkubiert. Legionellen werden auf ABCYE Agarplatten angezogen und ebenfalls auf eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt. Von je 1.5 ml Kultur bzw. Resuspension werden die Zellen durch Zentrifugation für 2 min in einer Tischzentrifuge bei 4°C sedimentiert. Das Pellet wird in 1 ml PBS resuspendiert und erneut für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen in 150 µl 10 mM Tris/HCl pH 7.5, 20 % Saccharose aufgenommen. Es werden 5 µl einer 0.5 M EDTA-Lösung zugegeben und für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wird in 100 µl eiskalter 25 mM MgCl₂-Lösung resuspendiert. Nach 10 min Inkubation auf Eis erfolgt die letzte Zentrifugation für 5 min. Im Überstand befinden sich die periplasmatischen Proteine. Als Positivkontrolle für die cytoplasmatischen Proteine wird die Osmolyse der Periplasma-Präparation nicht mit 25 mM MgCl₂, sondern mit eiskaltem Wasser durchgeführt. Die Zellen werden zur besseren Lyse stark gevortext und zusätzlich mit Deoxycholat lysiert. Die Analyse erfolgt im SDS-PAGE bzw. Westernblot.

3.9.13 Chemische Quervernetzung von Proteinen (Cross-linking)

Für die Quervernetzung von Proteinen auf bakteriellen Zelloberflächen oder in Lösungen wird das bifunktionale Reagenz Dimethylpimelimidat (DMP) verwendet. Dieses Reagenz besitzt zwei reaktive Gruppen, die Amidbindungen mit freien primären Aminogruppen in Lysinresten eingehen. DMP verbindet kovalent räumlich assoziierte primäre Aminogruppen und ermöglicht daher die Analyse von Proteinen in Hinsicht auf spezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen. Die Zellen werden in 0.1 M Na-Phosphat-Puffer pH 9.1 resuspendiert und zweimal gewaschen und zentrifugiert (4000 rpm, 10 min). Das Vernetzungsreagenz wird aus einer unmittelbar vorher im selben Puffer hergestellten Lösung in Konzentrationen von 1-20 mM verwendet und zusammen mit den Zellen für eine Stunde bei 25°C inkubiert. In einer sich anschließenden

Zentrifugation (10 min, 4000 rpm) werden die Zellen pelletiert. Da es sich um membranständige Proteine handelt, können diese nachfolgend mit 1 % Triton-X-100 in (0.1 M Na-Phosphat) von der Zelloberfläche abgelöst und von den restlichen Zellbestandteilen durch Zentrifugation abgetrennt werden (20 min, 4000 rpm). Der Überstand wird einer TCA-Fällung unterzogen und das erhaltene Pellet in SDS-Probenpuffer aufgenommen und im SDS-PAGE analysiert. In Lösung befindliche Proteine können ebenfalls durch Quervernetzungsexperimente untersucht werden, um Aussagen über ihren Dimerisierungsstatus machen zu können. Dazu werden diese in definierten molaren Mengen (1-1000 nM) eingesetzt und analog des oben beschriebenen Vorgehens für eine Stunde mit dem Reagenz DMP in 0.1 M Phosphat-Puffer pH 9.1 inkubiert, anschließend einer TCA-Fällung unterzogen und im Westernblot analysiert.

3.9.14 Protein-Anreicherung mittels Immunpräzipitation

Zur Anreicherung der zuvor mit Cross-linker auf der Oberfläche von *Legionella* fixierten Protein-Protein-Interaktion können Antikörper verwendet werden, die eine spezifische Detektion des Komplexes ermöglichen. Dazu werden Antikörper über ihren Fc-Teil an Protein G gebunden, welches kovalent an Sepharose-beads gekoppelt ist. Diese können durch Zentrifugation leicht sedimentiert und damit isoliert werden. Zur Durchführung der Immunpräzipitation wird im „batch“ Verfahren gearbeitet, da hier eine ungehinderte Interaktion der zu analysierenden Komponenten möglich ist. Alle Reaktionen werden bei 4°C auf einem Rotationsschüttler (30-50 rpm) in 1.5 ml Eppendorfgefäßen durchgeführt.

50-100 µl der Protein G Sepharose werden 1 mal in PBS gewaschen und nachfolgend mit 100-200 µl Antikörper und 800 µl „binding buffer“ (Immunopure plus, Pierce) ÜN inkubiert. Nach erfolgter Bindung der Antikörper an die Protein G Sepharose-beads werden diese mindestens 4 mal gewaschen. Dazu werden die Sepharose-beads durch Zentrifugation (3000 rpm) sedimentiert und in 1 ml KW-Puffer resuspendiert. Anschließend werden die Antikörper durch den Einsatz von DMP kovalent an die Protein G Sepharose gebunden. Die Cross-linking Reaktion wird in 0.1 M Phosphat-Puffer pH 9.1 mit einer finalen DMP Konzentration von 10 mM für eine Stunde auf einem Rotationsschüttler bei RT durchgeführt. Nachfolgend wird erneut mindestens 4 mal mit KW-Waschpuffer gewaschen. Anschließend erfolgt durch Zugabe von 200 µl der durch Triton abgelösten Membran-Bestandteile von *Legionella* (vgl. 3.9.12) die Antigen-Antikörper Reaktion. Dazu wird ein Gesamtvolumen von mindestens 700 µl durch Auffüllen mit TBS pH 7.5 eingestellt. Auch diese Reaktion wird ÜN bei 4°C durchgeführt. Abschließend wird erneut mit KW-Puffer intensiv mindestens 5 mal gewaschen und das Sepharose-Pellet in Laemmli-Puffer ohne Zusatz reduzierender Agenzien (DTT, 2-Mercaptoethanol) aufgenommen und

durch 5-10 minütiges Kochen bei 100°C eluiert. Zur Analyse der Immunpräzipitate werden Westernblot-Analysen, Silbergefärbung und Elektrotransfer auf PVDF-Membran mit anschließender N-terminaler Sequenzierung durchgeführt.

Lösungen:

<u>KW-Waschpuffer:</u>	30 mM	Hepes pH 7.5
	25 mM	KCl
	7 mM	MgCl ₂
	0.25 %	Inositol
	0.25 mM	EDTA
	0.1 %	NP 40 (Igepal)

-Protein G Sepharose (PIERCE)

-0.1 M Phosphat-Puffer pH 9.1

-DMP (Dimethylpimelidat)

3.9.15 Proteinreinigung mittels Umkehrphasen-HPLC und N-terminale Sequenzierung

Zur Bestimmung der molekularen Masse und zur N-terminalen Ansequenzierung wurden die erzeugten Mip-Proteinvarianten mittels HPLC entsalzt und aufkonzentriert. Die Proteingemische wurden im SDS-PAGE aufgetrennt und mit 50 mM Na-Borat-Puffer (20 % Methanol) pH 9.0 auf eine PVDF/ Selex 20-Membran geblottet. Nachfolgend wurden die Banden durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht und die gewünschte Bande ausgeschnitten. Die anschließende N-terminale Sequenzierung erfolgte durch Edman-Abbau mit dem pulsed-liquid-Sequencer Modell 476A von Applied Biosystems (Foster City, USA) und wurde von Peter Rücknagel (Halle) durchgeführt.

3.9.16 Bestimmung der molekularen Masse

ESI- und MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Elektrosprayionisations (ESI)-Massenspektren wurden mit einem VG Bio-Q Tripel Quadrupol-Massenspektrometer mit Elektrospray Interface (Fison Instruments) von Angelika Schierhorn (Halle) durchgeführt.

Gelfiltration

Zur Bestimmung der molekularen Masse der Mip-Proteinvarianten durch Gelfiltration wurden die Säule Superdex 75 PC 3.2/30 (SMART-System; Pharmacia, Uppsala, Schweden) verwendet. Die Kalibrierung erfolgte mit Eichproteinen (Boehringer Mannheim, BRD) im Bereich von 12,5 bis 66 kDa, die im jeweiligen Puffer (10 mM Hepes-Puffer (150 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂) pH

7.8) gelöst waren. Katalase diente zur Bestimmung des Ausschlussvolumens. Diese Arbeiten wurden von Bettina König (Halle) durchgeführt.

3.10 Southernblot

Um die Hybridisierung von markierter Sonden-DNA mit spezifischen DNA-Fragmenten zu untersuchen, werden diese zuvor elektrophoretisch in einem Agarosegel ÜN aufgetrennt und durch das VacuGene-Blotting-System auf eine Nylon-Membran transferiert. Mittels dieser Methode können spezifische DNA-Fragmente oder Gene von Organismen identifiziert und deren Lokalisation innerhalb des Chromosoms bestimmt werden.

Lösungen:

<u>Depurinierungslösung:</u>	HCl	0.25 M
<u>Denaturierungslösung:</u>	NaOH	0.5 N
	NaCl	1.5 M
	H ₂ O bidest.	ad. 500 ml
<u>Neutralisationslösung:</u>	Tris/HCl, pH 7.5	0.5 M
	NaCl	1.5 M
	H ₂ O bidest.	ad. 500 ml
<u>20 x SSC:</u>	NaCl	3.0 M
	Na-Citrat	0.3 M
	H ₂ O bidest.	ad. 1000 ml

-5 x SSC

-0.4 N NaOH

-0.2 M Tris/HCl

-ECL-Detektionslösungen A und B

Die Blotting-Kammer wurde entsprechend den Angaben des Herstellers zusammengesetzt und eine Vakuumpumpe angeschlossen. Für den Transfer wird eine Nylonmembran so zurecht geschnitten, dass sie die entsprechende Gelgröße um 0.5 cm überragt. Die Membran wird für 5 min in 20 x SSC getränkt und in die Blotting-Kammer eingelegt. Nach Auflegen einer passenden Plastikmaske (etwas kleiner als Gel und Membran) kann das Gel aufgelegt und ein Vakuum von 55-60 mbar angelegt werden. Das Gel wird vollständig mit Depurinierungslösung bedeckt. Nachdem sich die Bromphenolblau-Bande des Gels unter Einwirkung der Depurinierungslösung gelb verfärbt hat (nach ca. 45 min), wird diese vollständig entfernt und für den gleichen Zeitraum einmal mit Denaturierungslösung und anschließend mit Neutralisationslösung überschichtet. Der eigentliche Membrantransfer erfolgt für eine Stunde

mit 20 x SSC, wobei die DNA durch die hohe Salzkonzentration aus dem Gel verdrängt wird. Nach erfolgtem Transfer wird das Vakuum abgestellt, die Geltaschen mit einem Stift auf der Membran markiert und das Gel entfernt. Nach Entfernung restlicher Agarose wird die Membran zum Denaturieren für 30 sec in 0.4 M NaOH gelegt und anschließend für 30 sec in 0.2 M Tris/HCl neutralisiert. Nachdem die Membran luftgetrocknet wurde, wird durch UV-Crosslinking die DNA an die Membran gebunden und kann nun für Hybridisierungen verwendet werden.

3.10.1 Sondenmarkierung (Amersham)

Dieser Methode liegt zu Grunde, dass an ss-DNA gekoppelte Peroxidase nach erfolgter Hybridisierung mit komplementären DNA-Sequenzen sichtbar gemacht werden kann. Die Kopplung des Enzyms an positiv geladene Polymere ermöglicht dabei die Bindung an die negativ geladene ss-DNA durch ionische Wechselwirkung. Nach Zugabe von Glutaraldehyd kommt es zur Ausbildung von kovalenten Bindungen. Zum Sonden-labelling werden ca. 100 ng DNA in 10 µl H₂O_{bidest.} aufgenommen, für 5 min bei 100°C denaturiert und danach auf Eis gestellt. Nacheinander werden 10 µl „labelling mix“ und 10 µl „glutaraldehyd solution“ zugegeben und gevortext. Der Ansatz wird bei 37°C für 10 min inkubiert. Die Sonde kann entweder direkt verwendet oder bei -20°C in 50 % Glycerin aufbewahrt werden. Die verwendeten Lösungen werden dem ECL-Kit entnommen.

3.10.2 DNA-Hybridisierung

In diesem Arbeitsschritt wird die zuvor markierte ss-Sonde zu auf der Membran fixierten ss-DNA-Fragmenten gegeben. Bei Vorhandensein homologer Sequenzen kommt es zur Hybridisierung und somit zur Ausbildung markierter partieller Doppelstränge.

Lösungen:

<u>Hybridisierungslösung:</u>	Hybridisierungspuffer	200 ml
	(aus dem Kit)	
	NaCl	0.5 M
	Blocking-Reagenz	5 %
<u>Waschlösung I:</u>	0.5 x SSC	
	SDS	0.4 % (w/v)
	Harnstoff	6 M
	H ₂ O _{bidest.}	ad. 1000 ml

<u>Waschlösung II:</u>	0.2 x SSC	
	SDS	0.1 % (w/v)
	H ₂ O bidest.	ad. 1000 ml

-20 x SSC

Die Membran wird kurz in 5 x SSC geschwenkt und zur Absättigung der noch freien Bindungsstellen in eine Hybridisierungsröhre gegeben und für mindestens eine Stunde bei 42°C unter Zusatz vorgewärmter Hybridisierungslösung (ca. 0.125 ml/cm) im Drehofen vorhybridisiert. Für die eigentliche Hybridisierung werden 15 ml neue Hybridisierungslösung eingesetzt und 10 µl der denaturierten markierten Sonden-DNA zugegeben und für 12 h bei 42°C inkubiert. Zur Entfernung überschüssiger Sonden-DNA wird für 5 min mit 5 x SSC inkubiert. Anschließend wird mit auf 42°C vorgewärmtem Waschpuffer I für 20 min im Hybridisierungsofen gewaschen. Der Waschpuffer wird abgegossen und unter erneutem Zusatz von Waschpuffer I 2 x für 10 min bei 42°C inkubiert. Nach Überführung der Membran in eine Schale wird 2 x 5 min bei RT mit Waschpuffer II gewaschen. Die Hybridisierungsereignisse werden mittels ECL-Detektion (vgl. 3.10.3) sichtbar gemacht und ausgewertet.

3.10.3 Chemilumineszenz-(ECL)-Entwicklung

Zur Detektion der Peroxidase-gekoppelten Sonde bzw. Antikörper wird die Membran mit den zuvor im Verhältnis 1:1 vereinigten Detektionslösungen A (Wasserstoffperoxid) und B (Luminol) für eine 1 min überschichtet. Die Detektionslösung wird abgegossen und die Membran mit der Oberseite in Haushaltsfolie gelegt und diese auf der Rückseite umgeschlagen und so in eine Exponierkassette eingelegt. In der Dunkelkammer kann ein Blaulicht-sensitiver Film aufgelegt und entwickelt werden. Die von der Peroxidase katalysierte Reduktion von H₂O₂ lässt Oxidationen O₂⁻ entstehen, die zur Oxidation von Luminol und damit zur Entstehung von blauem Licht führen. In Abhängigkeit von der Signalstärke können für variable Zeiten neue Filme exponiert werden, um eine optimale Belichtung zu gewährleisten. Die Entwicklung erfolgt in einer automatischen Entwicklermaschine.

3.11 Fluoreszenz gestützte Methoden

3.11.1 Fluoreszenzmikroskopie

Für die *in vivo* Betrachtung der Amöben und der internalisierten GFP-markierten Legionellen wird ein inverses Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 25) von Zeiss verwendet. Für das *in vivo* Monitoring werden die Infektion wie unter 3.6.1 beschrieben durchgeführt und direkt bei 0, 3,

12, 24, 48 h betrachtet. Die Ereignisse werden mittels einer Niedriglicht-Kamera aufgenommen und können mit der Standard-Software (Adobe Photoshop) bearbeitet werden.

3.11.2 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Erfassung von bis zu acht verschiedenen Parametern auf Einzelzellebene und das für eine fast beliebig hohe Anzahl an Zellen. Unter Verwendung von Standardgeräten wie dem hier benutzten FACSCalibur der Firma Becton Dickinson können nicht nur morphologische Eigenschaften wie Größe und Granularität, sondern auch die Expression von Antigenen nach spezifischer Immunfärbung gemessen werden. Eine neue Möglichkeit fluoreszierende Signale zu erzeugen, ist die Expression von fluoreszierenden Proteinen. Ein Beispiel hierfür ist das Green Fluorescent Protein (GFP). Das Protein emittiert, nach Anregung mit Licht der Wellenlänge im Bereich von 480-501 nm grünes Licht der Wellenlänge 507-511 nm und kann so detektiert werden.

Das Durchflusszytometer (FACS für Fluorescence Activated Cell Sorting/Scanning) besteht aus einem Flüssigkeits- und einem optischen System. Durch das unter Druck stehende Flüssigkeitssystem werden die Zellen mittels eines Trägerstroms mit konstanter Geschwindigkeit an einem Laser vorbei geführt. Das auftreffende Laserlicht wird zunächst in zwei Richtungen gestreut: das nach „vorne“ (Forwardscatter FSC) und „zur Seite“ (Sidewardscatter SSC) abgelenkte Licht ist ein Maß für Größe und Granularität der Zelle. Darüber hinaus kann der Laser die Chromogene in zwei Wellenlängen zur Emittierung von Lichtquanten anregen, die dann in elektrische Impulse umgewandelt werden und auf Sensoren treffen. Die Parameter der gemessenen Ereignisse können entweder einzeln im Histogramm oder gegeneinander im Dot Plot aufgetragen werden. Die Auswertung der Daten erfolgt am MacIntosh mit dem Programm Cell Quest.

3.11.3 Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten (Spektrofluorimetrie)

Die Bestimmung der GFP-Fluoreszenzintensitäten erfolgt in einem SPEX FluoroMax Fluorimeter. Die zu analysierenden GFP-markierten *Legionella*-Stämme werden auf ABCYE Agarplatten angezogen (48 h, 37°C, 5 % CO₂) abgeschwemmt und auf eine OD von 0.1 gebracht. Die Zellzahl wird auf 5×10^6 /ml eingestellt und die Fluoreszenzemission über einen Wellenlängenbereich von 450-550 nm gemessen. Bei einer festen Anregungswellenlänge von 488 nm (Anregungsmaximum von GFP) wird die Fluoreszenzemission bei 507 nm gemessen. Nachfolgend werden Aliquots der analysierten Stämme ausplattiert, um die exakte Anzahl der

Zellen im Assay zu bestimmen. Die angegebenen Fluoreszenzwerte (arbitrary units = willkürliche Einheiten) werden auf 5×10^6 Zellen standardisiert.

3.12 *L. pneumophila* Infektion im Tiermodell

Als Standardtiermodell für Legionellen-Infektionen wird das Meerschweinchen verwendet. Die chirurgischen Eingriffe zur intratrachealen Infektion der Tiere wurden freundlicher Weise von Herrn Prof. Dr. Frosch und Frau Dr. Lüneberg durchgeführt.

Dazu werden die 500-1000 g schweren und 6-8 Wochen alten Tiere narkotisiert, die Brustregion sterilisiert und die Trachea frei präpariert. Die Infektion wird durch Applikation eines Inokulums von 5×10^6 bis 1×10^7 Legionellen in 300 μ l physiologischer NaCl-Lsg. eingeleitet. Die genaue Anzahl der injizierten Bakterien wird nachfolgend nochmals überprüft, indem ein Aliquot des Inokulums entnommen und die genaue Zellzahl bestimmt wird. Nach Applikation des Inokulums wird die Wunde vernäht. Die Infektion kann sich für einen Zeitraum von 48 h im Tier etablieren. Nach Ablauf dieser Zeit werden die Tiere reinem CO₂ ausgesetzt, was den schnellen Tod zur Folge hat. Zur Quantifizierung der Infektionen werden die Tiere im Brustbereich eröffnet und die gesamte Lunge (linke und rechte Lunge) heraus präpariert. Hat die Infektion einen schwerwiegenden Verlauf, kann dies zu diesem Zeitpunkt durch das Auftreten von hämorrhagischen Läsionen im Lungengewebe festgestellt werden. Darüber hinaus ist eine Vergrößerung des Organs zu beobachten. Linke und rechte Lunge werden getrennt gewogen und durch Zusatz von 0.9 % NaCl mittels Mörsern durch Metallsiebe homogenisiert. Das dabei verwendete Volumen wird notiert, da die Angabe der Zellzahl sich auf die in diesem Volumen homogenisierte Gesamtlunge bezieht. Von dieser Lösung werden Verdünnungsreihen angefertigt $10^{-1} - 10^{-8}$ und auf BCYE-Agarplatten ausplattiert. Die Zellen werden über einen Zeitraum von 3-5 Tagen bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert und die CFU-Werte bestimmt. Die Quantifizierung erfolgt generell durch einen doppelten Ansatz. Aliquots des Homogenats werden auf Blutagarplatten ausgebracht, um eventuelle sekundäre Infektionen der Lunge auszuschließen. Die so erhaltenen CFU-Werte werden auf die ml/Gesamtlunge bezogen und auf ein verwendetes Inokulum von 1×10^7 Zellen standardisiert. Mit jedem der im Tiermodell analysierten Legionellen-Stämme wurden mindestens 3 Tiere infiziert.