

2. Material

2.1. Versuchstiere

Folgende Mausstämme wurden verwendet:

Balb/c byJ-Mäuse (Balb/c)	Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA
B6.129P2-IL10 ^{tm1Cgn} -Mäuse (IL10 ^{-/-})	Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA
C57 BL/6J-Mäuse (BL6)	Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA
B6.129S2-TGFb1 ^{tm1Doe} -Mäuse (TGF- β ^{+/-})	Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA
Do11.10-Mäuse (Do11.10)	Deutsches Rheumaforschungszentrum, Berlin

2.2. Chemikalien und Lösungen

Die verwendeten Chemikalien und Lösungen wurden von folgenden Herstellern bezogen:

Agarose	PEQ Lab (Erlangen, D)
Albumin bovin Fraction V	Serva
Aqua dest.	laboreigene Anlage
BSA	SERVA (Heidelberg, D)
Calciumchloride entwässert 95 %	Roth
Concanavalin A (ConA)	Sigma (Steinheim, D)
DEPC-H ₂ O	Sigma
Diluent Concentrate1 (ELISA)	CT
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck (Darmstadt, D)
DMEM	Biochrom
DPBS	Cambrex (Verviers, B)
EDTA	Merck (Darmstadt, D)
Entellan	Merck
Essigsäure 100 wasserfrei	Merck (Darmstadt, D)
Ethanol 96 % reinst	Sigma (Seelze, D)
Ethanol 96 % vergällt	Universitätsapotheke Halle
FCS	Biochrom (Berlin, D)
G418 (Geneticin)	Gibco
Glutaraldehyd	SIGMA
HCL-Alkohol	VWR

HEPES	Sigma (Steinheim, D)
Imject® Alum	Pierce (Bonn, D)
Immersionsöl	Merck (Darmstadt, D)
Isofluran	Abbott (Wiesbaden, D)
Isopropanol	Sigma (Steinheim, D)
$K_3Fe(CN)_6$	Merck
Kaliumchlorid	VWR
Kanamycin	Gibco
L-Glutamin	Biochrom
Lysepuffer	Universitätsapotheker Halle
Magnesiumchlorid	VWR
Mercaptoethanol	Sigma
Methacholinchlorid	Sigma (Steinheim, D)
Methanol	VWR
NaCl-Lösung 0,9 %ig, steril	Baxter (Unterschleißheim, D)
Natriumazid (NaN_3)	Merck (Darmstadt, D)
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Merck (Darmstadt, D)
Natriumchlorid (NaCl)	Applichem (Darmstadt, D)
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Merck (Darmstadt, D)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma (Steinheim, D)
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)	Merck (Darmstadt, D)
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth (Karlsruhe, D)
Nonidet P 40 (NP40)	Roche (Mannheim, D)
Nutridoma	Roche (Mannheim, D)
Ovalbumin (OVA)	Sigma (Steinheim, D)
PenStrep	Biochrom (Berlin, D)
Pepstatin A	Sigma
Phenol/Chloroform Isoamyl Alkohol	Sigma
Proteinase K	Sigma (Steinheim, D)
RPMI-Medium	Biochrom
Salzsäure 37 % rauchend (HCl)	VWR (Darmstadt, D)
Schwefelsäure (H_2SO_4)	VWR (Darmstadt, D)
Stickstoff (flüssig)	laboreigene Anlage
Streptavidin HRP	R&D (Wiesbaden, D)
Sucrose	VWR
Thymidin Methyl	Perkin Elmer
Tissue Wax Einbettmittel	medite

TMB (Tabletten)	Sigma (Steinheim, D)
Tris	Roth (Karlsruhe, D)
Trizol	Invitrogen
Tryphanblau	Gibco
Tween 20	Calbiochem (Darmstadt, D)
Wasserbad-Schutzmittel	VWR
Wasserstoffperoxid 30 %ig (H ₂ O ₂)	VWR (Darmstadt, D)
X-Galaktosidase	Gibco
Xylol	Merck (Darmstadt, D)
Zitronensäure	Applichem (Darmstadt, D)

2.3. Farbstoffe

Bromphenolblau	Merck
Eosin	Merck (Darmstadt, D)
Ethidiumbromid	Sigma (Steinheim, D)
Giemsa Lösung	Merck
MAYERS Hämalaun	Merck (Darmstadt, D)
May-Grünwald	Merck
Perjodsäure	Merck (Darmstadt, D)
Schiffsreagenz	Merck (Darmstadt, D)
Trypanblau	VWR (Darmstadt, D)

2.4. Zellen

cos7 cells	Stratagene
XL1 blue Competent Cells	Stratagene

2.5. Lösungen, Puffer und Medien

2x HBS-Lösung (HEPES-buffered saline)

NaCl	280 mM
KCl	10 mM
Na ₂ HPO ₄ -2H ₂ O	1,5 mM
Dextrose	12 mM
HEPES	50 mM
NaOH	pH auf 7,1 einstellen

TES-Puffer, pH 7,5 (1l)

Tris-HCL (pH 7,5)	10 mM
EDTA (pH 7,5)	1 mM
NaCl	10 mM
H ₂ O	add 1l

Detergenz-Puffer (100 ml)

Tris (pH 8,3)	9,9 ml (100 mM)
KCl	500 mM (0,37g)
Nonidet P40 (NP40)	0,045 % (45 µl)
Tween 20	0,045 % (45 µl)
H ₂ O	add 100 ml

DPBS-Tween20 (1l)

DPBS	1000 ml
Tween20	500 µl

Giemsa-Lösung

Giemsa	120 ml
H ₂ O (pH 7,2)	80 ml
Essigsäure (konz.)	12 ml

SOB-Medium (1l)

bacto-tryptone	20 g
yeast-Extrakt	5 g
NaCl	0,5 g
KCl (250 mM)	10 ml
mit NaOH auf pH 7 einstellen, autoklavieren	
MgCl ₂ (2 M)	5 ml
H ₂ O	add 1l

LB-Medium (1l)

Pepton aus Casein	10 g
yeast Extract	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O	add 1l
mit NaOH auf pH 5 einstellen	

Extraktionslösung

H ₂ O	320 µl
EtOH 96 %	7,6 ml
konz. HCL	0,16 ml
Pepstatin A (5 mg in 1 ml Methanol)	8 µl
PMSF (871 mg in 25 ml Isopropanol)	670 µl

Calcium-Phosphat-DNA-Präzipitations-Ansatz

H ₂ O	219 µl
2xHBS Lösung	0,25 ml
DNA (TGF-β-Vektor)	2 µg
CaCl ₂ -Lösung	31 µl

2.6. Puffer, Lösungen und Antikörper für ELISA

Carbonat-Puffer:	150 mM Na ₂ CO ₃ ; 350 mM NaHCO ₃ ; 20 % (w/v) NaN ₃ ; pH 9,6
Citrat-Phosphat-Puffer:	0,1 M Zitronensäure; 0,2 M Na ₂ HPO ₄ ; pH 5,0
ELISA-Waschpuffer:	PBS; 0,05 % (v/v) Tween 20
ELISA-Blockpuffer:	PBS; 1 % (w/v) BSA; 5 % (w/v) Sucrose; 0,05 % (w/v) NaN ₃
TGF- β ELISA-Blockpuffer:	PBS; 5 % (v/v) Tween 20; 5 % (w/v) Sucrose; 0,05% (w/v) NaN ₃
Serum Diluent (SD):	PBS; 0,1 % (w/v) BSA; 0,05 % (v/v) Tween 20
TGF-β Serum Diluent:	PBS; 1,4 % (v/v) DuoSet®Diluent-Konzentrat; 0,05 % (v/v) Tween 20
ELISA-Stopplösung:	2 N H ₂ SO ₄
ELISA-Substrat-Lösung:	1 Tablette TMB in 10 ml Citrat-Phosphat-Puffer (pH 5,0) auflösen und 2 µl H ₂ O ₂ zusetzen

Antikörper:

Für die ELISA wurden Quantikine DuoSet®-ELISA-Kits der Firma R&D Systems verwendet: anti-Maus IL-4, anti-Maus IL-5, anti-Maus IL-10, anti-Maus IL-13, anti-Maus IFN-γ, anti-Maus TGF-β₁.

Zum Nachweis von OVA-spezifischen Serum-Antikörpern wurden HRP-konjugierte Antikörper der Firma Southern Biotechnology bzw. BETHYL verwendet:

Ziege anti-Maus IgE, Ziege anti-Maus IgG₁, Ziege anti-Maus IgG_{2a}.

2.7. Molekularbiologische Reagenzien

fertige Systeme („Kits“):

Taq PCR-Kit	Qiagen (Hilden, D)
DuoSet® TGF-β	R&D Systems
EndoFree™ Plasmid Giga Kit	Qiagen
Gel Purifikation MinElut Gel Extraktionskit	Qiagen
Qiafilter Plasmid Endofree Giga Kit	Qiagen

Primer:

Die für die PCR eingesetzten Oligonukleotid-Primer wurden von der Firma MWG Biotech AG synthetisiert. Sie wurden sie in Aqua dest. gelöst (100 pmol/μl), aliquotiert und bei -20°C gelagert.

mIL-10 antisense	3'-GCA GTC GAC TTA GCT TTT CAT TTT GAT CAT CA- 5'
mIL-10 sense	5'-ACA CTC GAG CAT CAT GCC TGG CTC AGC- 3'
mβ-actin-antisense	3'- AAA CGC AGC TCA GTA ACA GTC GCG CTA GAA -5'
mβ-actin-sense	5'-TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA CTA CAT -3'
mTGFβ-antisense	3'- CAT GTC GAC TCA GCT GCA CTT GC- 5'
mTGFβ-sense	5'- CTA CTC GAG ATG GCC CTG GAT AC- 3'
pIRES2/EGFP-as783	5'-GCC CTC ACA TTG CCA AAA GAC G-3'
IL-10-s451	5'-TGT CAT CGA TTT CTC CCC TGT G-3'
Neo R1	5' – AGA CAA TCG GCT GCT CTG AT – 3'
Neo R2	5' – CAA TAG CAG CCA GTC CCT TC – 3'
Primer IMR031	5' – GAG AAG AAC TGC TGT GTG CG – 3'
Primer IMR032	5' – GTG TCC AGG CTC CAA ATA TAG G – 3'

Plasmide: pCCALL; pIRES2-EGFP; pPCR Script Amp SK+ (Clontech)

Probenpuffer: 1 mM EDTA; 20 % (v/v) Glycerin; 0,5 % (w/v) Bromphenolblau; 0,05 % (w/v) Xylencyanol

Laufpuffer: 1 x TAE-Puffer

Standard: Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot, D)

Weitere Reagenzien	CIAP-Phosphatase + Puffer	Gibco
	Deoxyribonuclease I (DNA-se)	Fermentas
	Pfu turbo DNA Polymerase	Stratagene
	Plasmide	Clontech
	Primer Oligo (dt)	MWG AG Biotech
	Restriktionsenzyme	MBI Fermentas
	Superscript™ II Reverse Transkriptase	Promega
	T4 DNA Ligase	MBI-Fermentas
	Taq DNA Polymerase (Rekombinat)	Invitrogen

2.8. Laborgeräte und Apparaturen

Absaugsystem mit Vakuumpumpe	VWR (Darmstadt, D)
Bakterien-Schüttler	VWR (Darmstadt, D)
Brutschrank BBD6220	Heraeus (Gera, D)
Elektrophoresegerät Consort E143	PEQ Lab (Erlangen, D)
Elektrophorese-Kammer	PEQ Lab (Erlangen, D)
ELISA-Platten-Washer Elx 50	BIO-TEK (Bad Friedrichshall, D)
Feinwaage	Sartorius (Göttingen, D)
Fluor-S TM Multi Imager	BioRad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)
Ganzkörper-Plethysmograph	EMKA (Paris, F)
HERA Safe	Heraeus (Gera, D)
Heraeus Biofuge fresco	Kendro (Hanau, D)
INOTECH Harvester	Perkin Elmer (Freiburg, D)
Kamera SPOT INSIGHT 3 Shot QE	VISITRON SYSTEMS GmbH (Puchheim, D)
Laminar-Air-Flow	Heraeus (Gera, D)
Magnetrührwerk (MR 3001)	Heidolph (Kelheim, D)
Multifuge 3 S-R, Rotor Sorvall	Heraeus (Gera, D)
PCR-Gerät MultiCycler PTC 200	Biozym (Oldendorf, D)
pH-Meter Qph 70	VWR (Darmstadt, D)
Power Supply	peqlab (Erlangen, D)
Rotations-Mikrotom	MICROM (Walldorf, D)
Tiefkühltruhe -80°C	Heraeus (Gera, D)
Ultra Microplate Reader Elx 808	BIO-TEK (Bad Friedrichshall, D)
Ultraschallinhalationsgerät	Schill Medizintechnik (Ulm, D)
Vortexer	VWR (Bruchsal, D)
Wasserbad	VWR (Darmstadt, D)
Zeiss Axioskop 40	Carl Zeiss (Göttingen, D)