

3. Methoden

3.1. Arbeiten im Tiermodell

3.1.1. Tiere

Die Zucht und Haltung erfolgte in der Maushaltung der Medizinischen Fakultät im BioZentrum Halle. Die Tiere wurden je nach Behandlungsprotokoll im Alter von 8 Tagen bzw. 5 bis 8 Wochen behandelt. Alle Versuche waren genehmigt durch die Tierschutzbehörde der Bezirksregierung Sachsen-Anhalt.

3.1.2. Behandlungs- und Immunisierungsprotokolle

Protokoll zur präventiven Vektor-Applikation in Balb/c-Mäuse

Wie in [Abbildung 2](#) dargestellt, erhielten Balb/c-Mäuse im Alter von 5 bis 6 Wochen vier intranasale Gaben von 100 µg/ml endotoxinfreier IL-10-Plasmid-DNA in 40 µl endotoxinfreiem TE-Puffer. Die Applikation erfolgte unter Isofluran-Narkose an den Tagen 1, 3, 15 und 17 des Protokolls. Kontrolltiere wurden mit dem mock-Vektor (pIRES) oder TE-Puffer behandelt. Zur Sensibilisierung erhielten die Tiere OVA (20 µg) gelöst in 100 µl 0,9 %iger NaCl-Lösung und 100 µl Imject ALUM intraperitoneal an den Tagen 5 und 18, gefolgt von drei intranasalen Gaben von 20 µg OVA in 40 µl isotonischer NaCl-Lösung an den Tagen 18, 19 und 20. Kontrolltiere bekamen intraperitoneal 100µl ALUM in 100µl NaCl-Lösung und intranasal 40 µl NaCl-Lösung. An Tag 22 wurde die AHR (siehe Punkt 3.1.3.) bei aufsteigenden Konzentrationen vom Metacholin gemessen. Einen Tag später erfolgte die Sektion der Mäuse.

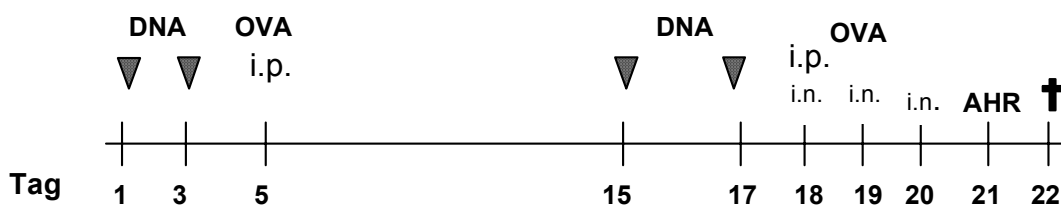


Abbildung 2: Protokoll zur präventiven Vektor-Applikation in Balb/c-Mäuse. Unten stehen die verschiedenen Behandlungstage, darüber ist die Art der Behandlung gekennzeichnet. Sie erfolgte in Form von intranasaler DNA-Applikation, intraperitonealen (i.p.) bzw. intranasalen (i.n.) OVA-Gaben und an Tag 21 wurde die Lungenfunktion gemessen. An Tag 22 geschah die Tötung der Tiere.

Protokoll zur therapeutischen Vektor-Applikation in Balb/c-Mäuse

Innerhalb der ersten Hälfte des in [Abbildung 3](#) dargestellten Behandlungsprotokolls wurden Balb/c-Mäuse durch zwei intraperitoneale Injektionen von OVA in Alum und drei intranasale OVA-Gaben auf das Modellantigen Hühner-Ovalbumin sensibilisiert. An Tag 17 wurde der Sensibilisierungserfolg durch die Messung der AHR überprüft und anschließend erfolgten drei intranasale Gaben der Plasmid-DNA an den Tagen 18, 23 und 28. An Tag 30 wurde die Lungenfunktionsmessung wiederholt, an Tag 31 wurden die Tiere getötet und die BAL-Flüssigkeit, Blut, Lunge und Milz entnommen.

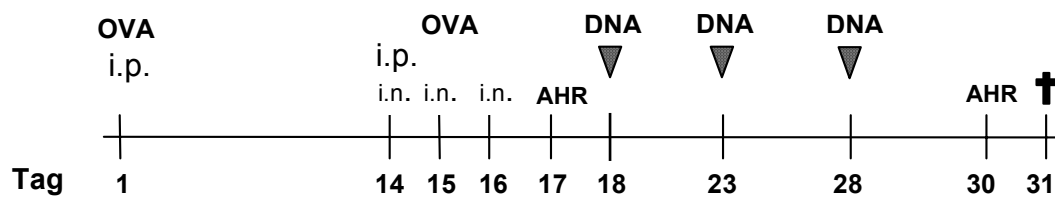


Abbildung 3: Protokoll zur therapeutischen Vektor-Applikation in Balb/c-Mäuse. Unten stehen die verschiedenen Behandlungstage von 1 bis 31, darüber die Art der Behandlung.

Protokoll zur neonatalen Vektor-Applikation in Balb/c-Mäuse

Wie in [Abbildung 4](#) zu sehen, erhielten acht Tage alte Balb/c-Mäuse unter Isofluran-Narkose jeweils intranasale Gaben von 10 µg/ml endotoxinfreier Plasmid-DNA in je 10 µl endotoxinfreiem TE-Puffer. Die Kontrolltiere wurden mit mock-Vektor in 10 µl TE-Puffer bzw. ausschließlich mit TE-Puffer behandelt. Die Plasmid-Behandlung wurde am 15. Lebenstag mit 20 µg DNA in 20 µl Puffer und am 22. Lebenstag mit 30 µg DNA in 30 µl Puffer wiederholt. Im Alter von 5 Wochen erfolgte die Sensibilisierung auf OVA wie oben beschrieben. Die Lungenfunktionsmessung geschah an Tag 52 und die Tiere wurden am darauf folgenden Tag seziert.



Abbildung 4: Protokoll zur neonatalen Vektor-Applikation in Balb/c-Mäuse. Unten steht das Alter der Tiere in Lebenstagen, darüber ist die Art der Behandlung gekennzeichnet.

Protokoll zur präventiven Vektor-Applikation in IL-10^{-/-}-Mäuse

Es wurden B6.129P2-IL10^{tm1Cgn}- (IL-10^{-/-}) Mäuse und C57BL6/J-Mäuse (WT-Kontrolltiere) verwendet. Die Tiere wurden nach dem in [Abbildung 5](#) gezeigten Protokoll auf OVA sensibilisiert. Dazu erhielten sie 6 intranasale Applikationen von OVA in NaCl-Lösung und zwei intraperitoneale Gaben von OVA in Alum. Im Gegensatz zu Balb/c-Mäusen sind für die IL-10^{-/-}-Mäuse und BL6-Mäuse drei zusätzliche intranasale OVA-Gaben an den Tagen 26, 27 und 29 nötig, um eine starke AHR zu erzeugen. Die Behandlung mit dem IL-10-Vektor bzw. dem mock-Vektor (je 100 µg pro Maus) erfolgte intranasal an vier Tagen (vor und während der OVA-Sensibilisierung).

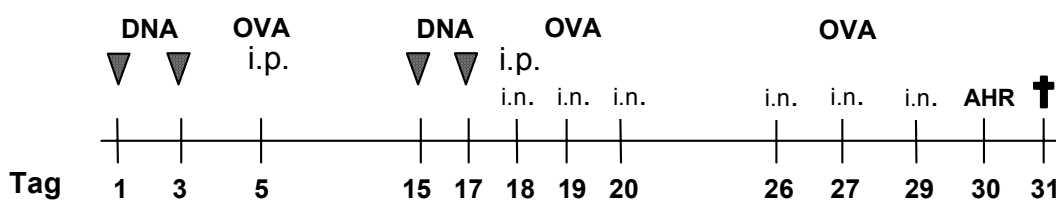


Abbildung 5: Protokoll zur präventiven Vektor-Applikation in IL-10^{-/-}- und BL6-Mäuse. Unten ist der Tag der Behandlung aufgetragen, darüber ist die Art der Behandlung gekennzeichnet.

Protokoll zur OVA-Sensibilisierung von TGF-β^{+/-}- und BL6-Mäusen

Die [Abbildung 6](#) zeigt das Sensibilisierungsprotokoll für die Mäuse in den Versuchen zum Einfluss einer reduzierten TGF-β-Expression im murinen Asthma-Modell. Die Tiere erhielten an Tag 1 und 14 jeweils eine intraperitoneale Injektion von OVA in Alum. Darauf folgten sechs intranasale Gaben von OVA in NaCl-Lösung unter Isofluran-Narkose. Kontrolltiere wurden i.p. mit Alum und i.n. mit NaCl-Lösung behandelt. An Tag 25 wurde unter Metacholin-Provokation die AHR gemessen und an Tag 26 erfolgte die Sektion der Mäuse.

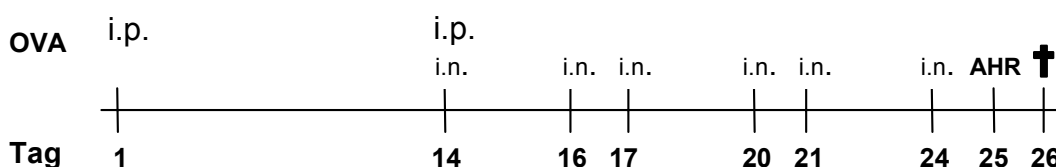


Abbildung 6: Protokoll zur OVA-Sensibilisierung von TGF-β^{+/-}-Mäusen und BL6-Mäusen. Oben die Art der Behandlung in Form von intranasalen oder intraperitonealen OVA-Applikationen, unten ist der Tag der Behandlung aufgetragen.

3.1.3. Messung der Atemwegshyperreagibilität

Die Lungenfunktion wurde nach Inhalation von zunehmenden Konzentrationen von Metacholin in einem Ganzkörperplethysmographen für Mäuse (Model PLT UNR MS, EMKA TECHNOLOGIES, Paris) nach folgendem Protokoll gemessen:

- | | |
|--|---------------------------------|
| 1. Adaptationsphase | 2 min |
| 2. Verneblungsphase | 3 min z.B. 0,9 %ige NaCl-Lösung |
| 3. Pause | 2 min |
| 4. Messung | 4 min |
| 5. Pause | |
| 6. Wiederholung ab Punkt 2 mit Metacholin entsprechend der Konzentrationsreihe | |

Die Mäuse sitzen einzeln in Boxen aus Plexiglas und inhalierten zunächst 0,9 % NaCl-Lösung zur Ermittlung des Basalwertes und danach Metacholinlösung in ansteigenden Konzentrationen (2,5 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml und 20 mg/ml; Inhaliergerät Schill Medizintechnik). Nach jeder Inhalation wird die Lungenfunktion erneut gemessen und die gewonnenen Daten ($Penh_{Metacholin}$) werden als Prozent des nach NaCl (0,9 %) Inhalation gewonnenen Basalwertes ($Penh_{NaCl}$) ausgedrückt. Als Maßstab für die Obstruktion der Lunge gilt der „Penh“, welcher nach folgender Formel berechnet wird:

$$Penh = (Te/RT^{-1}) * (PEF/ PIF)$$

Penh – enhanced pause (dimensionslos), TE – expiratory time, RT – relaxation time, PEF – peak expiratory flow (ml/s), PIF – peak inspiratory flow (ml/s), (Te/RT^{-1}) – Pause.

Der Druck innerhalb der Plexiglasbox, in der die Maus sitzt verändert sich während der Einatmungs- (Inspiration) und Ausatmungsphase (Expiration). Diese Druckschwankungen werden über Messfühler ermittelt und zum Computer übertragen. Der Penh berücksichtigt die Veränderung des Kammerdrucksignals von Inspiration und Expiration (PIP, PEP) und kombiniert diese Veränderungen mit dem Verlauf von früher und später Expiration. Der zur Ermittlung von Penh, Minutenvolumen, Tidalvolumen und Atemfrequenz zu ermittelnde Kammerdruck wird mit Hilfe eines Transducers (Modell DP-T, EMKA Technologies, Paris) gemessen. Der Transducer ist mit einem Verstärker (Modell AMPL14, EMKA Technologies, Paris) verbunden, über den die gesammelten Daten an einen mit der von EMKA Technologies entwickelten Software (IOX Bas-4, IOX-RF-4, Datenanalyst) ausgestatteten Computer geleitet werden. Dort erfolgt die Datensammlung und Datenanalyse.

3.1.4. Broncho-Alveolare Lavage (BAL)

Die Tiere wurden zur Sektion mit CO₂ getötet und der linke Lungenflügel wurde für die Lungenhistologie mit einem dünnen Baumwollfaden abgebunden. Die Luftröhre wurde mit einem Katzenkatheter trachektomiert und der rechte Lungenflügel wurde dreimal vorsichtig mit je 400 µl DPBS gespült. Die Spülflüssigkeit wurde in einem Eppendorftube gesammelt und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert. Das Volumen der gesammelten Lavage-Flüssigkeit wurde schriftlich festgehalten und floss in die spätere Berechnung der absoluten Zellzahl/ml ein. Die Zellzahl in der Lavage-Flüssigkeit wurde in einer Zählkammer bestimmt, die Zelldifferenzierung erfolgte Anhand von May-Grünwald-Giemsa gefärbten Zytopspin-Präparaten. Es wurden jeweils 100 Zellen im Lichtmikroskop nach morphologischen Kriterien differenziert. Dabei wurden ausschließlich Monozyten bzw. Makrophagen, Lymphozyten, neutrophile Granulozyten und eosinophile Granulozyten gezählt. Erythrozyten, oder Epithelzellen fanden dabei keine Berücksichtigung.

3.1.5. Entnahme des Blutes

Das Herz der getöteten Mäuse wurde punktiert und das Blut mit Hilfe einer Pipette in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen gesammelt. Die Tubes wurden etwa 1 Stunde bei RT inkubiert und danach 10 min bei 3,5 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Serum abpipettiert und für die Bestimmung der IgE, IgG₁ und IgG_{2a}-Werte bei -20°C gelagert.

3.1.6. TGF-β-Extraktion aus Geweben von TGF-β^{+/-}- und WT Mäusen

Zur Bestimmung der TGF-β-Level in Geweben von TGF-β-heterozygoten- und WT-Mäusen wurde frisch isoliertes Gewebe (Milz, Lunge) oder Serum homogenisiert und mit einer Extraktionslösung über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler extrahiert.

Nach der Extraktion wurden die Proben abzentrifugiert (10.000 g, 10 min, 4°C) und zur Aufkonzentration der Zytokine erfolgte eine Dialyse in Dialysepuffer (4 mM HCl, 100-faches Volumen der Proben).

Die Dialyse erfolgte in drei Schritten:

1. Dialyse ca. 2 Stunden bei 4°C
2. Dialyse ca. 2-3 Stunden bei 4°C
3. Dialyse über Nacht bei 4°C

Nach der Zentrifugation der Proben (13.000 g, 10 min, 4°C) wurden die TGF-β-Spiegel mittels ELISA für TGF-β (DuoSet®, R&D Systems, Minneapolis, USA) entsprechend der Herstellerangaben bestimmt. Das Detektionslimit lag bei 8 pg/ml.

3.1.7. Bestimmung des Inflammationsgrades und der Mukusekretion der Lungen

Die Auswertung des Inflammationsgrades erfolgte in H&E-gefärbten Parafin-Lungenschnitten, die Auswertung der Mukusekretion in PAS-gefärbten Parafinschnitten mittels Bildanalyse (siehe Punkt 4.4. – Entwicklung eines neuen Verfahrens der Quantifizierung verschiedener pathologischer Parameter mittels morphometrischer Bildanalyse). Die Präparate wurden dazu abfotografiert (drei Aufnahmen pro Lunge) und mit dem neu entwickelten Computerverfahren ausgewertet. Die positiv detektierten Pixel aus den drei Aufnahmen jeder einzelnen Lunge wurden zu jeweils einem Gesamtwert addiert.

Um das neue Auswertungsverfahren zu etablieren, wurde die Entzündungsreaktion und Mukusekretion in den Parafinschnitten der Lungen von TGF-β^{+/-}-Mäusen und WT-Tieren lichtmikroskopisch nach einer gebräuchlichen 4-stufigen Skala (0-keine Entzündung; 1-leicht entzündet; 2-mäßig entzündet; 3-stark entzündet; bzw.: 0-kein Mukus; 1-wenig Mukus; 2-mäßig viel Mukus; 3- viel Mukus) von einem unabhängigen Gutachter (Frau Dr. Taege) bewertet.

3.2. Zellkultur-Methoden

3.2.1. Allgemeines zur Arbeit mit Zellen in Kultur

Die Arbeiten mit Zellen in Kultur erfolgten unter Sterilwerkbänken. Pipettenspitzen wurden vor Gebrauch autoklaviert und die Arbeiten mit Zellen erfolgten auf Eis. Die Zentrifugation von Zellen erfolgte bei 300 g für 7 min bei 4°C. Zum Zählen der Zellen wurde die Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau (Gibco, Eggenstein) gemischt um die toten Zellen anzufärben. Anschließend wurden in einer Neubauer-Zählkammer die ungefärbten (lebenden) Zellen gezählt. Aus der erhaltenen Zellzahl x in den 16 Quadraten der Zählkammer errechnet sich die Zellzahl pro ml nach der Formel:

$$\text{Zellzahl / ml} = x * \text{Verdünnungsfaktor} * 10^4 / \text{ml}$$

3.2.2. Herstellung und Restimulation einer Zellkultur aus der Milz

Die Tiere wurden mit CO₂ getötet, die Milzen entnommen, mit einer Schere zerkleinert und mit einem sterilen Spritzenstempel durch ein Zellsieb (70 µm Maschenweite) gedrückt. Die Zellen wurden in DPBS aufgefangen, gewaschen und 5 Minuten bei 250 g und 4°C zentrifugiert. Zur Entfernung der Erythrozyten wurde das Zellpellet in 1 ml Lysepuffer pro Milz resuspendiert und zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiterem zweimaligen Waschen in DPBS wurde die Zelldichte gezählt und auf die gewünschte Dichte durch entsprechende Verdünnung mit Zellkulturmedium (RPMI-Medium mit 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin) eingestellt. In 24 Well-Mikrotiterplatten wurden Triplikate von 5x10⁶ Zellen/ml mit jeweils 200 µg/ml OVA oder 200 µg/ml Concanavalin A (Sigma) stimuliert und für 36 Stunden im CO₂-Inkubator (5 % CO₂; 90 % relative Luftfeuchtigkeit; 37°C) kultiviert. Anschließend konnten die Überstände für die Bestimmung der Zytokin-Konzentrationen bei -20°C verwahrt werden.

3.2.3. Proliferationstest

Zur Prüfung der biologischen Aktivität des aus dem Vektor synthetisierten TGF-β₁ wurde die proliferationshemmende Wirkung von TGF-β genutzt. Milzzellen einer Do11.10-Maus wurden *in vitro* mit 0 oder 100 oder 200 µg OVA/ml stimuliert. Zur Hemmung der Proliferation wurden unterschiedlich stark verdünnte Mediumüberstände der TGF-β transfizierten cos7-Zellen zugegeben. Nach 24 Stunden wurde ein Proliferationstest durchgeführt.

Zur Untersuchung der Proliferation wurde die DNA-Synthese durch den Einbau von [3H-Methyl]-Thymidin nachgewiesen. In 96-Well-Mikrotiterplatten wurden die verschiedenen Proben jeweils in Triplikaten inkubiert. Als Negativkontrolle dienten Zellen ohne OVA-Stimulation und als Positivkontrolle mit Concanavalin A (Sigma) stimulierte Zellen. Die Inkubation erfolgte in einem CO₂-Inkubator (5 % CO₂; 90 % relative Luftfeuchtigkeit; 37°C) über einen Zeitraum von 48 Stunden. 16 Stunden vor Ablauf der Inkubationszeit wurde [3H-Methyl]-Thymidin in einer radioaktiven Konzentration von 1 µCi pro Well zugegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit einem Zell-Harvester auf einen Filter gesaugt und sechsmal mit destilliertem H₂O gewaschen. Auf diese Weise wurden die Zellen auf dem Filter fixiert und die nicht in die Zellen aufgenommenen, radioaktiven Nukleotide entfernt. Der Filter wurde 30 Minuten bei 70°C auf einer Heizplatte getrocknet, mit Meltinex-Wachs versiegelt und es erfolgte die Messung der Zerfallsreaktionen (counts per minute [cpm]) im TopCount-Mikroplate Scintillation-Counter (Perkin Elmer).

3.2.4. Calcium-Phosphat Transfektion

Um nachzuweisen, dass der hergestellte TGF- β -Vektor in Zellen exprimiert wird, wurde der pIRES-TGF- β Vektor in cos7-Zellen transfiziert.

Die Transfektion erfolgte mit Calcium-Phosphat nach folgendem Protokoll: der Calcium-Phosphat-DNA-Präzipitations-Ansatz wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, damit sich Calcium-Phosphat-DNA-Präzipitate bilden konnten. Die zu transfizierenden cos7-Zellen wurden mit DPBS gewaschen und anschließend wurde zu den Zellen 2 ml Transfektionsmedium (DMEM mit 4 mM L-Glutamin; 100 U/ml Penicillin; 100 μ g/ml Streptomycin; 10 % FCS) gegeben. Der Calcium-Phosphat-DNA-Präzipitations-Ansatz wurde tropfenweise auf die cos7-Zellen pipettiert und über Nacht im CO₂-Inkubator (5 % CO₂; 90% relative Luftfeuchtigkeit; 37°C) inkubiert.

Die Selektion erfolgte mit G418 und optischer Kontrolle (Grünfluoreszenz). Stark fluoreszierende Klone wurden für 24 Stunden in TGF- β -freiem Medium (Nutridoma) kultiviert und anschließend wurde die TGF- β -Konzentration im Medium mittels ELISA bestimmt.

3.3. Molekularbiologische Methoden

3.3.1. Konstruktion der Vektoren

Für die Versuche zur intranasalen DNA-Applikation in Mäuse wurde der Vektor pIRES2-EGFP (Clontech Laboratories, Palo Alto, USA) gewählt, der über eine vorgeschaltete „Intra ribosomal entry side“ (IRES) die gleichstarke Expression eines Kandidatengens und eines Reportergens (GFP – green fluorescent protein) erlaubt ([Abbildung 7](#)).

Die Kandidatengene (IL-10, TGF- β) wurden aus Maus-Lymphozyten isoliert, durch Ligation in den Vektor eingebracht und das Plasmid in *Echerichia coli* Bakterienkulturen transformiert. Für die *in vivo* Versuche in Mäusen wurden große Mengen der Plasmid-DNA aus der Bakterienkultur isoliert.

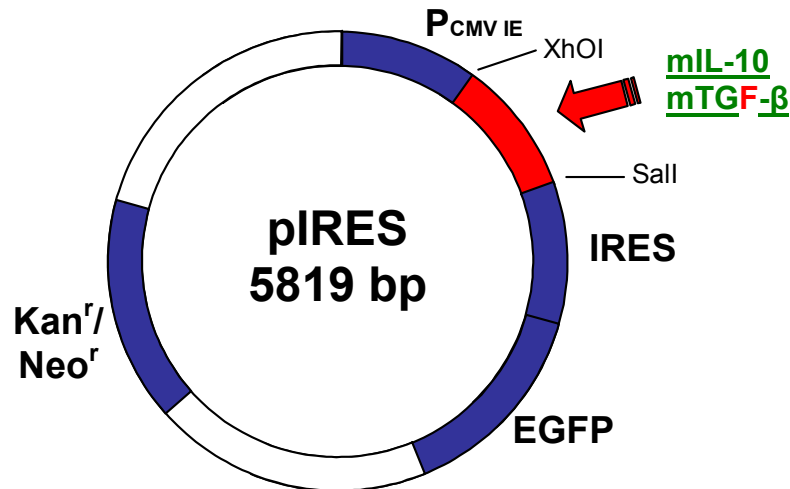


Abbildung 7: Der Vektor pIRES2-EGFP mit dem integrierten Insert mIL-10 (Maus-Interleukin-10) beziehungsweise mTGF- β (Maus-Transforming-growth-factor- β) und den verwendeten Restriktionsschnittstellen XhoI und SalI. Der Vektor enthält eine Kanamycin- Neomycin-Resistenz (Kan^r/Neo^r) und den Promotor P_{CMV-IE} (immediate early promoter of cytomegalovirus).

3.3.2. Herstellung des IL-10- und des TGF- β -Inserts

RNA-Präparation aus Zellen: Das Gen für mIL-10 bzw. mTGF- β wurde aus Do11.10-Maus-Lymphozyten isoliert. Die Zellen wurden bei 1000 g sedimentiert, der Überstand verworfen und zur Lyse der Zellen das Pellet mit 0,2 ml Trizol[®] (Life Technologies, Karlsruhe, Germany) versetzt und durch Auf- und Abpipettieren mit einer Kanüle homogenisiert. Nach 5-minütiger Inkubationszeit erfolgte die Zugabe von 0,2 ml Chloroform pro 1 ml Homogenat, die Reaktionsgefäße wurden 1 Minute mit dem Vortexer geschüttelt und dann 5 Minuten auf Eis gestellt. Nach einer Zentrifugationszeit von 15 Minuten bei 4200 rpm und 4°C wurde die wässrige (obere) Phase in ein neues Gefäß überführt und mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform versetzt. Die Gefäße wurden gut geschüttelt und 5 Minuten auf Eis gestellt, dann erfolgte nochmals eine Zentrifugation über 15 Minuten bei 4200 rpm und bei 4°C. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und mit der gleichen Menge Isopropanol (2-Propanol) versetzt. Nach dem Vortexen wurde die RNA eine Stunde lang bei -20°C gefällt und konnte bei 4°C und 12 000 g sedimentiert werden. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol in DEPC-H₂O gewaschen, steril unter einer Laminar-Air-Flow getrocknet und in DEPC-H₂O aufgenommen.

c-DNA Synthese: Vor Beginn der c-DNA-Synthese erfolgte ein DNase-Verdau. Dazu wurde 1 µl DNase auf 15 µl RNA-Lösung gegeben und 30 Minuten inkubiert. Zur Umwandlung der RNA in Einzelstrang-DNA wurde die RNA-Menge im Spektrometer ermittelt und 2 µg RNA in die cDNA-Synthese eingesetzt. Es folgte die c-DNA-Synthese mit oligo- (dT) Primern und SuperscriptTM II Reverse Transkriptase (200 U/µl) entsprechend den Herstellerangaben.

PCR: Die c-DNA wurde mittels PCR mit spezifischen Primern für IL-10 (sense 5'-ACA CTC GAG CAT CAT GCC TGG CTC AGC- 3' und antisense 3'-GCA GTC GAC TTA GCT TTT CAT TTT GAT CAT CA- 5') amplifiziert. Die PCR erfolgte mit Pfu-turbo-DNA-Polymerase in einem Volumen von 50 µl bei 94°C für 30 s, bei 60°C für 30 s und bei 72°C für 1,30 min mit 45 Zyklen durchgeführt.

Als Kontrolle für die erfolgreich c-DNA-Synthese dienten Maus β-actin-Primer (mβ-actin-sense 5'-TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA CTA CAT -3' und mβ-actin-antisense 3'-AAA CGC AGC TCA GTA ACA GTC GCG CTA GAA -5'); für die Amplifizierung der mTGF-β c-DNA wurden die Primer TGF-β 5'- CTA CTC GAG ATG GCC CTG GAT AC- 3' und TGF-β 3'- CAT GTC GAC TCA GCT GCA CTT GC- 5' verwendet.

3.3.3. Herstellung des IL-10- und des TGF-β-pIRES-EGFP-Vektors

Aufreinigung: Das Gen (IL-10 bzw. TGF-β) wurde über eine elektrophoretische Auftrennung auf einem Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel (0,8 %) und durch eine anschließende Gelextraktion (Gel Purifikation MinElut Gel Extraktionskit, Quiagen) aufgereinigt und mit Pfu-turbo DNA-Polymerase amplifiziert (PCR siehe oben).

Ligation: Bei 15°C wurde das Insert über Nacht mit T4-DNA-Ligase (MBI-Fermentas) entsprechend der Herstellerangaben in den PCR-cloning-Vektor (pPCR-Script Amp SK+ plasmid) ligiert.

Transfektion in *E. coli*: Anschließend erfolgte eine Transfektion in *E. coli* X1-Blue ultrakompetente Zellen (Stratagene). 100 µl Bakterienzellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 2 µl Mercaptoethanol versetzt. Nach 5 Minuten wurden 10 ng der IL-10- bzw. TGF-β-Plasmide zugegeben. Nach 20 Minuten auf Eis wurde das Reaktionsgefäß für 45 Sekunden auf 42°C erhitzt um die Aufnahme der Plasmide in die Zellen zu erleichtern. Danach wurden die Zellen nochmals 5 Minuten auf Eis gelagert. Nach Zugabe von 45 ml SOB-Medium (versetzt mit 100 µg/ml Ampicillin) wurden die *E. coli* Bakterien 60 Minuten bei 37°C im Bakterien-Schüttler kultiviert und anschließend jeweils 100 µl Bakteriensuspension auf einer

Ampicilin-Agarplatte ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht im Brutschrank gelagert und am nächsten Tag konnten einzelne Klone von den Platten isoliert werden.

Plasmid-DNA-Präparation aus *Echerichia coli*: Die Bakterienklone wurden in 1,5 ml LB-Medium über Nacht im Bakterienschüttler vermehrt, bei 13.000 rpm 3 Minuten bei 4°C zentrifugiert und die Pellets in 100 µl GTE (50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl pH 8) resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl 0,2N NaOH mit 1 % SDS wurden die Tubes vorsichtig geschüttelt und auf Eis gelagert bis die Lösung klar erschien. Es wurden dann 150 µl 3M NaOAc pH 5,3 zugegeben und die Tubes 10 min auf Eis gestellt, anschließend erfolgte eine Zentrifugation über 15 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C. Die Überstände wurden in neue Tubes überführt und mit der gleichen Menge Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) vermischt. Die Überstände wurden abzentrifugiert und die DNA wurde mit dem zweifachen Volumen Ethanol (96 %) bei -80 °C über 30 min gefällt. Das DNA-Pellet wurde abzentrifugiert, mit 70 %igen Ethanol (70 %) gewaschen und in TE-Puffer resuspendiert.

Der Transformationserfolg wurde durch einem XhoI/SalI Restriktionsverdau (Fermentas) nachgewiesen. Aus der verdauten Plasmid-DNA konnten auf einem analytischen Agarosegel Banden der richtigen Größe dargestellt werden. Transfizierte Bakterienklone wurden in Glycerol bei -80°C gesichert.

Sequenzierung: Die Sequenz der hergestellten Inserts IL-10 und TGF-β wurde durch eine Sequenzierung überprüft. Die Sequenzierung erfolgte durch Frau Dr. Petterson aus dem DNA-Service-Labor des Biozentrums der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Das Ergebnis der Sequenzierung wurde elektronisch mit der DNA von *Mus musculus* in der NCBI-Gen-Datenbank abgeglichen.

Restriktionsverdau: Zur Ligation der Inserts in den Zielvektor pIRES2-EGFP wurden die IL-10- bzw. TGF-β-Inserts aus dem PCR-cloning-Vektor (pPCR-Script Amp SK+ plasmid) mit den Restriktionsenzymen XhoI und SalI (Fermentas) ausgeschnitten (0,5 µl XhoI; 0,5 µl SalI; 1,5 µl Puffer 0⁺; 3 µl DNA; Inkubation 2 h bei 37°C), auf einem 0,8 % Agarosegel aufgetrennt und anschließend durch Gelextraktion mit dem Gel Purifikatio MinElut Gel Extraktionskit (Qiagen) aufgereinigt. Der pIRES-EGFP-Vektor wurde mit denselben Enzymen verdaut und ebenso auf einem Agarosegel aufgetrennt und aufgereinigt. Die beim Restriktionsverdau entstandenen Enden wurden mit CIAP Phosphatase (Gibco) dephosphoryliert.

Ligation: Bei 15°C wurde das Insert (IL-10 bzw. TGF- β) über Nacht mit T4-DNA-Ligase (MBI-Fermentas) entsprechend der Herstellerangaben in den pIRES2-EGFP Vektor ligiert.

Herstellung großer Plasmidmengen: Der pIRES-IL-10-Vektor und der pIRES-TGF- β -Vektor wurden in *Echerichia coli* X1-Blue ultrakompetente Zellen (Stratagene) transformiert und mit Kanamycin (30 μ g/ml) selektiert. Der Transformationserfolg wurde nach einem XhoI/SalI Restriktionsverdau (Fermentas) anhand von Banden der richtigen Größe auf einem analytischen Agarosegel nachgewiesen (Methoden siehe oben). Mit einem endotoxinfreien Mega-Kit (Quiagen) wurden große Mengen der Plasmide hergestellt, welche damit für die Applikation in Mäuse zur Verfügung standen.

3.3.4. Detektion des vektorspezifischen IL-10 in Lungen von Balb/c-Mäusen

Balb/c-Mäuse wurden an drei aufeinander folgenden Tagen intranasal unter Isofluran-Narkose (Forene) mit 40 μ l pIRES-IL-10-Vektor, mock-Vektor (pIRES) oder NaCl-Lösung (0,9 %) behandelt. An Tag 6 wurden die Lungen entnommen, in DPBS gespült und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Aus dem Lungengewebe erfolgte eine RNA-Präparation, anschließend eine c-DNA-Synthese und eine PCR wie oben beschrieben. Zur Analyse der IL-10-Expression wurden spezifische Primer gewählt (IL10-s451 sense: 5'-TGT CAT CGA TTT CTC CCC TGT G-3', pIRES/EGFP-as783 antisense: 3'-GCC CTC ACA TTG CCA AAA GAC G-5'), welche ein vektorspezifisches Amplifikationsprodukt von 332 Basenpaaren erzeugten. Die PCR erfolgte über 45 Zyklen bei 94°C für 30 s, bei 60°C für 30 s und bei 72°C für 1,30 min. Die erfolgreiche DNA-Synthese wurde durch eine PCR mit Maus β -actin Primern (5'-TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA CTA CAT-3' und 3'-AAA CGC AGC TCA GTA ACA GTC GCG CTA GAA-5') überprüft.

3.3.5. Screening von TGF- $\beta^{+/-}$ Mäusen

DNA-Präparation aus Gewebe: 4 Wochen alte Nachkommen von heterozygoten B6.129S2-TGF β_1^{tm1Doe} -Mäusen wurden mittels genomischer PCR auf das TGF- β_1 Wildtyp- und KO-Allel getestet. Die DNA wurde aus Gewebe der Schwanzspitzen extrahiert. Zur Fällung der DNA wurden die Mäuseschwänze in Detergenzienpuffer aufgenommen und über Nacht mit Proteinase K bei 50°C verdaut. Die Proteinase K wurde durch Erwärmen der Probe für 30 min auf 70°C inaktiviert. Danach wurden die Proben zentrifugiert, die Überstände in ein

neues Tube überführt und mit derselben Menge Isopropanol gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei -20°C wurde ein Pellet abzentrifugiert und mit 80 % Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde in $100\ \mu\text{l}$ TES-Puffer gelöst und für 30 min bei 55°C inkubiert.

PCR: Für die anschließende PCR wurden folgende Primer verwendet: A: 5'-GAG AAG AAC TGC TGT GTG CG-3' und 5'-GTG TCC AGG CTC CAA ATA TAG G-3' sowie B: 5'-AGA CAA TCG GCT GCT CTG AT-3' und 5'-GTG TCC AGG CTC CAA ATA TAG G-3'. Das erste Primer-Paar ist homolog zu Sequenzen des Exon 6 von TGF- β , das zweite Primer-Paar amplifiziert Neomycin-spezifische Sequenzen in den mutanten Mäusen. Die PCR-Synthese erfolgte mit Taq-Polymerase über 35 Zyklen (94°C für 1 min, 60°C für 30 s und 72°C für 2 min) und im Anschluss 72°C für 10 Minuten. Die PCR-Produkte wurden mit Ethidiumbromid auf 0,8 %igem Agarosegel sichtbar gemacht.

3.4. Immunologische Methoden

3.4.1. Messung der Zytokin- und Immunglobulinspiegel mittels ELISA

Die Nachweisreaktion der Zytokin- und Immunglobulinspiegel mittels ELISA beruht auf der Umsetzung eines chromogenen Substrates durch ein Enzym, das an einen Antikörper gekoppelt ist. ELISAs auf IL-4; IL-5; IL-10; IL-13; TGF- β und IFN- γ wurden mit dem DuoSet[®] (R&D Systems, Minneapolis, USA) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die Messung erfolgte im Mediumüberstand der Lymphozytenkultur nach 3 Tagen Inkubationszeit. Für die Messung von TGF- β ist Block-Puffer und Serum-Diluent ohne BSA-Zusatz verwendet worden. Die TGF- β -Proben mussten zudem mit HCl voraktiviert werden. Dafür wurden zu 0,5 ml Probe 0,1 ml 1N HCl gegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben mit 0,1 ml einer 1,2 N NaOH/0,5 M HEPES Lösung neutralisiert und anschließend auf die ELISA-Platten aufgetragen. Nach der Farbentwicklung wurde die Reaktion mit Abstoppreagenz (2 N H_2SO_4 Lösung) abgestoppt und bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzfilter 540/570) die Extinktionen gemessen. Das Detektionslimit lag bei 8 pg/ml.

OVA-spezifisches IgE, IgG₁ und IgG_{2A} wurden im Serum mittels ELISA nach einem Standardprotokoll gemessen: 96-Well-Mikrotiterplatten (Nunc, Roskilde, Denmark) wurden über Nacht mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ OVA, gelöst in Bikarbonat-Puffer (pH 9.6), gecoatet. Nach dem

Waschen und Blocken der Platten wurden die Proben 2 Stunden bei Raumtemperatur auf den Platten inkubiert und die Platten schließlich erneut gewaschen. HRP-konjugierte goat-anti-mouse-IgE Antikörper (Bethyl Laboratories, Inc; Montgomery, TX; USA), IgG₁ oder IgG_{2A} Antikörper (Southern Biotechnology Associates, Inc. Birmingham, USA) wurden zugegeben. Die Platten wurden mit Tetramethylbenzidine als Substrate entwickelt und die Extinktionswerte wurden mit einem Bio-Rad Microplate-Reader (Bio-Rad, Munich, Germany) bei 450 nm bestimmt.

Die Titer wurden durch logarithmische Regression als reziproke Verdünnung des Serums am Punkt der zweifachen Hintergrund-Extinktion berechnet. Zur Ermittlung der Hintergrund-Extinktion wurde die Extinktion von 1:100 verdünnten Seren unbehandelter Mäuse gemessen und der Mittelwert als Hintergrund-Extinktion definiert.

3.4.2. Detektion des vektorspezifischen IL-10 in den Lungen

Balb/c-Mäuse wurden an drei aufeinander folgenden Tagen intranasal unter Isofluran-Narkose mit 100 µg pIRES-IL-10-Vektor in 40 µl TE-Puffer bzw. mit 100 µg mock-Vektor (pIRES) in 40 µl TE-Puffer oder ausschließlich mit 40 µl endotoxin-freiem TE-Puffer behandelt. An den Tagen 3, 7, 9, 11, 14 und 18 wurden jeweils 2 Tiere getötet, die Trachea intubiert und die Lunge zweimal mit je 800 µl DPBS gespült (BAL). In der BAL-Flüssigkeit wurde die IL-10-Konzentration mittels ELISA (DuoSet[®]; R&D Systems, Minneapolis, USA) bestimmt.

3.4.3. Histologische Methoden

Nach der Tötung der Tiere mit CO₂ wurde der linke Lungenflügel für die Lungenhistologie mit einem dünnen Baumwollfaden abgebunden. Der Lungenflügel wurde entnommen und in einer Einbettkassette in 4 %igem Formalin fixiert. Im Pathologischen Institut der MLU Halle-Wittenberg wurden die Proben im Einbettautomat in Parafin eingebettet.

Die nachfolgenden histologischen Arbeiten wurden durch Frau Jana Bergmann ausgeführt. Die Proben wurden am Mikrotom im Biozentrum geschnitten und auf Objektträger aufgebracht. Es folgte die Entparaffinierung der Proben im Wärmeschrank bei 80°C und in einer absteigenden Alkoholreihe:

Xylol	5 min
96 % Alkohol	5 min
70 % Alkohol	10 min
fließend kaltes Wasser	kurz spülen
Aqua dest.	kurz spülen

Im Anschluss wurden die Präparate mit Hämalaun-Eosin bzw. mit PAS gefärbt (siehe unten). Der Entzündungsgrad der Lunge sowie die Mukusproduktion wurde durch morphometrische Bildanalyse mit dem Computerprogramm HistoClick bestimmt.

Für die Differenzierung der Zellen in der BAL wurden die Zellen aus der Bronchio-Alveolaren-Spülflüssigkeit durch Zentrifugation der BAL-Zellsuspensionen bei 85 g für 10 min bei 4°C mit Hilfe von speziellen Adaptern für die Zentrifuge (SORVALL) auf den Objektträger gebracht. Diese Zytospinpräparate wurden über Nacht luftgetrocknet und anschließend mit May-Grünwald/ Giemsa-Färbung (Pappenheim) gefärbt.

3.4.4. HE (Hämalaun-Eosin)-Färbung

Die in destilliertem Wasser gespülten Schnitte wurden für maximal 4 Minuten in Hämalaun gestellt, danach in 1 %igem HCl-Alkohol differenziert bis kernreiche Areale makroskopisch sichtbar wurden und zum Abstoppen schnell mit warmem Wasser gespült. Danach wurden die Schnitte für 5 Minuten in Eosin (0,5 %, wässrig) gestellt. Zuletzt erfolgte eine Entwässerung der Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Das Eindecken geschah mit Entellan (Merck) und einem Deckglas.

3.4.5. PAS-Färbung

Die in destilliertem Wasser gespülten Objektträger mit den Lungenschnitten wurden für 10 bis 15 Minuten in Periodsäure (0,7 % in 70 % Ethanol) gestellt, dann zweimal in Wasser gespült und mit Schiffs-Reagenz gefärbt bis der Schleim in den Präparaten deutlich pink erschien. Dann wurden die Objektträger unter fließendem, kaltem Leitungswasser gespült und nochmals 5 Minuten im Wasser stehen gelassen. Anschließend erfolgte eine Gegenfärbung der Schnitte mit Hämalaun (Kernfärbung) über einen Zeitraum von einer Minute. Die Präparate wurden kurz in HCl-Alkohol (1 % in ca. 70 % Ethanol) differenziert, in warmem Wasser gespült und über Nacht luftgetrocknet. Über eine aufsteigende Alkoholreihe

erfolgte die Entwässerung der Schnitte, anschließend wurden die Präparate mit Entellan und einem Deckglas eingedeckt.

3.4.6. May-Grünwald/ Giemsa-Färbung (Pappenheim)

Für die Färbung der BAL-Zytospin-Präparate wurden die luftgetrockneten Zytospin-Präparate für 4 Minuten in unverdünnte May-Grünwald-Lösung (Merck) gestellt, danach mit Leitungswasser (pH 7) gründlich gespült und anschließend für 1 min in verdünnte Giemsa-Lösung (Merck) gestellt. Nach wiederholtem gründlichen Spülen mit Leitungswasser wurden die Präparate luftgetrocknet und konnten dann im Lichtmikroskop bei einer 1000fachen Vergrößerung mit Hilfe von Immersionsöl differenziert werden.

3.4.7. Lokalisierung der Vektorexpression mittels β -Gal-Färbung

Die β -Gal-Färbung ist eine histochemische Färbung von β -Galactosidase in Zellen und Gewebe. Um *in vivo* zeigen zu können, welche Zellen in den Lungen von Mäusen nach intranasaler Applikation von Plasmid-DNA transfiziert werden, wurde ein lacZ-haltiger Kontrollvektor (pCCALL2) verwendet. Dieser Vektor codiert die cDNA für β -Galactosidase und wurde an drei aufeinander folgenden Tagen unter Isofluran-Narkose intranasal in Balb/c-Mäuse gegeben (je 100 μ g pro Maus). Kontrolltiere erhielten stattdessen den pIRES-Vektor. Nach weiteren 3 Tagen wurden die Tiere getötet, die Lungen entnommen, auf Korkplättchen mit Tissue-Wax Einbettmittel (Mediate) bedeckt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zum Fixieren (2 mal 20 Minuten bei 4°C) und Färben (über Nacht bei 37°C) wurden folgende Lösungen verwendet:

Fixierlösung:		Färbelösung:	
dH ₂ O	2385 μ l	1 x DPBS	2427 μ l
20 x DPBS	150 μ l	20 x DPBS	18 μ l
37 % Formalin	81 μ l	100mM MgCl ₂	60 μ l
25 % Glutaraldehyd	24 μ l	500mM K ₃ Fe(CN) ₆	30 μ l
10 % NP 40	60 μ l	500mM K ₄ Fe(CN) ₆	30 μ l
<u>1 % NaDesoxycholat</u>	<u>300μl</u>	X-Gal (40mg/ml)	75 μ l
	3000 μ l	10 % NP 40	60 μ l
		<u>1 % NaDesoxycholat</u>	<u>300μl</u>
			3000 μ l

Danach erfolgte die Einbettung in Paraffin über eine aufsteigende Isopropanol-Reihe. Mit dem Mikrotom wurden 3 μm dicke Schnitte hergestellt und die Blaufärbung mikroskopisch überprüft.

3.4.8. Modifizierte Giemsa-Färbung

Die entparaffinierten Schnitte wurden für 20 Minuten in die vorbereitete Giemsa-Lösung gestellt und dann kurz in 96 %igem Ethanol gespült, bis alle Farbschlieren verschwunden waren. Die kernreichen Areale erschienen blau, Zytoplasma-reiche Areale rosa-rot. Die Schnitte wurden über Nacht getrocknet, dann 15 Minuten in Xylol gestellt und anschließend mit Entellan (Merck) eingedeckt.

3.5. Statistische Methoden

Die statistischen Auswertungen und graphischen Darstellungen wurden mit dem Programm Microsoft® Excel durchgeführt. Für die Versuche wurden die Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) von n unabhängigen Experimenten berechnet. Unterschiede in den Versuchsgruppen wurden unter Annahme einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ mittels t-Test nach Student für unverbundene Stichproben auf ihre Signifikanz geprüft. Als signifikant angesehen wurden p-Werte für $\alpha \leq 0,05$.