

6.2. Material

6.2.1. Laborgeräte

| | |
|--|-------------------------------------|
| Beta-Counter 1450 MikroBeta | Perkin Ellmer Wallac GmbH, Freiburg |
| Cell-Harvester | INOTECH, Schweiz |
| ELISA-Reader MRX | Dynatech, Denkendorf |
| ELISA-Waschgerät | Dynatech, Denkendorf |
| Flaming Brown Micropipette Puller P-97 | Sutter Instrument Co., USA |
| Fluoreszenzphotometer SFM 25 | BIO-TEK, Neufahrn |
| Spektralphotometer U 2000 | Hitachi, Japan |
| Thermocycler PCR System 9700 | Perkin Ellmer Wallac GmbH, Freiburg |
| Tansjektor 5246 | Eppendorf, Hamburg |
| Ultraschallgerät HD 200 | Bandelin, Berlin |
| Video-Dokumentationsgerät E.A.S.Y.RH | Herolab, Wiesloch |

6.2.2. Verbrauchsmaterialien

| | |
|------------------------------------|----------------------------------|
| Borsilikatglaskapillaren GC100F-10 | Harvard Apparatus, England |
| Dialyseschläuche | Serva, Heidelberg |
| Einwegkanülen | Henke Sass Wolf GmbH, Tuttlingen |
| Einwegpasteurpipetten | Corning Incorporated, USA |
| Einwegspritzen | Henke Sass Wolf GmbH, Tuttlingen |
| ELISA-Platten (Maxisorp) | Nunc, Wiesbaden |
| HC-Folie | Schleicher & Schuell, Dassel |
| Kryotubes | Greiner, Nürtingen |
| Mikropipetten | Brand, Wertheim |
| Petrischalen | Greiner, Nürtingen |
| Pipettenspitzen | Sarstedt, Nümbrecht |
| Polypropylenröhrchen | Greiner, Nürtingen |
| Reaktionsgefäße (1,5 und 2,0 ml) | Greiner, Nürtingen |
| Reaktionsgefäße (0,2 und 0,5 ml) | Greiner, Nürtingen |
| Sterilfilter | Schleicher & Schuell, Dassel |
| Zellkulturplatten | Costar, Bodenheim |
| Zitratröhrchen | Sarstedt, Nümbrecht |

6.2.3. Reagenzien

| | |
|--------------------------------|----------------------|
| ³ H-Thymidin | ICN, Eschwege |
| Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung | Roth, Karlsruhe |
| Agarose | Serva, Heidelberg |
| Antibiotika | Fluka, Schweiz |
| anti-CD3-Ak (Orthoclone-Okt13) | Janssen-Cilag, Neuss |
| Agar | Roth, Karlsruhe |
| APS | Roth, Karlsruhe |
| Brij 35 | Sigma, Deisenhofen |
| Bromphenolblau | Merck, Darmstadt |
| BSA | Applichem, Darmstadt |
| β-Mercaptoethanol | Sigma, Deisenhofen |
| Chlornaphtol | Serva, Heidelberg |
| Chloroform | Merck, Darmstadt |

| | |
|---------------------------------------|-------------------------------------|
| Concanavalin A | Pharmacia, Freiburg |
| Coomassie Blau R-250 | Pharmacia, Freiburg |
| DEPC | Roth, Karlsruhe |
| Dimethyl-Formamid | Roth, Karlsruhe |
| DNA-Marker Smart ladder | Eurogentec, Belgien |
| dNTP | Roth, Karlsruhe |
| DMSO | Roth, Karlsruhe |
| DTT | Applichem, Darmstadt |
| EDTA | Applichem, Darmstadt |
| Eiweißcystatin | Sigma, Deisenhofen |
| Ethidiumbromid | Applichem, Darmstadt |
| FCS | Biochrom KG, Berlin |
| Ficoll Paque | Amersham Pharmacia Biotech, England |
| Ficoll 400 | Serva, Heidelberg |
| Fluoreszenzsubstrate | Bachem, Heidelberg |
| Halocarbonöl | Sigma, Deisenhofen |
| Hefeextrakt | Roth, Karlsruhe |
| humanes AB-Serum | Prof Volk, Charite, Berlin |
| IFN- α | Biosource, USA |
| IFN- γ | TEBU, Frankreich |
| Imidazol | Applichem, Darmstadt |
| IPTG | Roth, Karlsruhe |
| L- Glutamin | Biochrom KG, Berlin |
| Milchpulver | Applichem, Darmstadt |
| Ovalbumin | Sigma, Deisenhofen |
| peqGOLD RNA-Pure | peqLab, Erlangen |
| Proteinmarker MW-Standard (mid range) | Promega, Mannheim |
| Proteinmarker MW-Standard vorgefärbt | Biolabs, USA |
| Ni-NTA-Agarose | Quiagen, Hilden |
| Oligonukleotide | Roth, Karlsruhe |
| Organische Lösungsmittel | Merck, Darmstadt |
| PHA | Pharmacia, Freiburg |
| PMSF | Serva, Heidelberg |
| PPD | Prof. von Baehr, Charite, Berlin |
| RPMI 1640 | Gibco BRL, Karlsruhe |
| Salze | verschiedene |
| SDS | Serva, Heidelberg |
| Squalane | Roth, Karlsruhe |
| Synperonic L101 | Serva, Heidelberg |
| Szintillationsmembran | Perkin Elmer, Finnland |
| TEMED | Roth, Karlsruhe |
| TMB-Substrat | Sigma, Deisenhofen |
| Triton X-100 | Serva, Heidelberg |
| Trypanblau | Gibco BRL, Karlsruhe |
| Trypton | Roth, Karlsruhe |
| Tween 20, Tween 80 | Serva, Heidelberg |
| Whatmanpapier | Schleicher & Schuell, Dassel |
| Xylencyanol | Fluka, Schweiz |

6.2.4. Enzyme

| | |
|------------------------|-------------------------------|
| DNase, RNase | Boehringer Mannheim, Mannheim |
| T4 DNA-Ligase | New England Biolab, USA |
| DNA-Restriktionsenzyme | AGS, Heidelberg |
| Taq-Polymerase | PAN Biotech GmbH, Aidenbach |
| Lysozym | Sigma, Deisenhofen |
| Papain | Sigma, Deisenhofen |
| Humanes Cathepsin B | Sigma, Deisenhofen |

| | |
|--------------------------------|--|
| Humanes Cathepsin L | CALBIOCHEM, Bad Soden |
| Humanes Cathepsin S | Prof. Wiederanders, Institut für Biochemie |
| | Universitätsklinik Jena |
| Shrimps Alkalische Phosphatase | USB, USA |
| M-MLV Reverse Transkriptase | Promega, Mannheim |
| RNase Out | Gibco BRL, Karlsruhe |

6.2.5. Kommerzielle Kits

| | |
|---|---------------------|
| BCA-Test | Pierce , USA |
| Gel-Extraktionskit QUIAEX II | Quiagen, Hilden |
| MEGAscript™ T3 | Ambion, USA |
| OPTEIA™ (IL-2, IL-10, IL-12(p40), IFN-γ, TNF-α) | Pharmingen, Hamburg |
| pGEM-T Easy Vector System | Promega, Mannheim |
| Plasmid-Mini-Kit | Clontech, USA |
| Plasmid-Midi-Kit | Clontech, USA |
| RNeasy Mini Kit | Quiagen, Hilden |

6.2.6. Synthetische Oligonukleotide

| | |
|---------------------|---|
| rCysele1 | |
| Forward-Primer | 5`> CAA ATT GCT GGT GGA TTG <3` |
| Reverse-Primer | 5`> AAT TTT TTC ATC AGG TTT CAC <3` |
| rCysele2 | |
| Forward-Primer | 5`> GGT ATG ATG ACT GGA GGA <3` |
| Reverse-Primer | 5`> GAA CTG CTC GTC AGC GGT <3` |
| rCysele1 | |
| T7 / Forward-Primer | 5`> TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAA TTT TTT CAT CAG GTT TCA <3` |
| T3 / Reverse-Primer | 5`> AAT TAA CCC TCA CTA AAG GCA AAT TGC TGG TGG ATT GTC <3` |
| rCysele2 | |
| T7 / Forward-Primer | 5`> TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA ACT GCT CGT CAG CGG TAA <3` |
| T3 / Reverse-Primer | 5`> AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGG TAT GAT GAC TGG AGG ATC <3` |
| oligo-dT | Roth, Karlsruhe |

6.2.7. Agarosegelelektrophoresepuffer

| | |
|----------------------------|-------------------------------------|
| 6 x Ladepuffer | 0,25 % Bromphenolblau |
| | 0,25 % Xylencyanol |
| | 15 % Ficoll 400 in H ₂ O |
| 10 x TAE Stock | 48,4 g Tris-HCl |
| | 20 ml 0,5 M EDTA, pH 8.0 |
| | 11,4 ml Eisessig |
| | add 1l H ₂ O |
| Ethidiumbromid-Stammlösung | 10 mg / ml in H ₂ O |

6.2.8. Puffer für Plasmidpräparationen

| | |
|---------------------------|---|
| Lysispuffer | 0,05 M Glucose 0,025 M TRIS-HCl, pH 8.0 0,01 M EDTA 1,5 N NaOH 1 % SDS 0,5 mg / ml RNase |
| Kaliumazetat / Essigsäure | 3 M Kaliumazetat, pH 6.0 |

6.2.9. Plasmide, *E. coli*-Stämme*E. coli* -Stämme

| | |
|--------------|------------------------|
| DH5 α | Stratagen, Heidelberg |
| xl-1blue | Stratagen, Heidelberg |
| BL21DE3 | Novabiochem, Bad Soden |

Plasmide

| | |
|---------|------------------------|
| pET 28a | Novabiochem, Bad Soden |
|---------|------------------------|

6.2.10. Kulturmedien für *C. elegans* und Bakterien

| | |
|--------------|---|
| NGM -Platten | 1,2 g NaCl 10 g Pepton 25 g Agar add 1000 ml dH ₂ O autoklavieren und auf ca. 55 °C abkühlen dazugeben: 1 ml Cholesterin (5 mg / ml in Ethanol) 1 ml 1 M MgSO ₄ 25 ml 1 M KH ₂ PO ₄ , pH 6.0 |
| S-Medium | 5,9 g NaCl 50,0 ml 1 M KH ₂ PO ₄ , pH 6.0 1,0 ml Cholesterin (5 mg / ml in Ethanol) add 1000 ml dH ₂ O autoklavieren und abkühlen; hinzufügen: 10,0 ml Kaliumcitrat, pH 6.0 10,0 ml Spurenelementlösung 3,0 ml 1 M CaCl ₂ 3,0 ml 1 M MgSO ₄ |

| | |
|---------------------|---|
| Spurenelementlösung | 1,86 g Na ₂ EDTA 0,69 g FeSO ₄ (4 H ₂ O) 0,2 g MnCl ₂ (4 H ₂ O) 0,29 g ZnSO ₄ (7 H ₂ O) 0,016 g CuSO ₄ add 1000 ml dH ₂ O |
| M9-Puffer | 3 g KH ₂ PO ₄ 6 g Na ₂ HPO ₄ 5 g NaCl 1 ml 1 M MgSO ₄ add 1000 ml H ₂ O |
| Bleiche | 29,25 ml H ₂ O 14,5 ml NaOCl 6,25 ml 5 N NaOH |
| LB-Medium | 10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl add 1 l H ₂ O, pH 7.5 |
| LB-Platten | LB-Medium 1,5 % Bacto-Agar |
| SOB-Medium | 20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 0,5 M NaCl 10 ml 0,25 M KCl ad 995 ml H ₂ O, pH 7.0 5 ml sterile 0,002 M MgCl ₂ |
| SOC-Medium | SOB-Medium 0,01 M sterilfiltrierte Glucose |
| X-Gal-Stammlösung | 20 mg / ml in Dimethyl-Formamid |
| IPTG-Stammlösung | 1 M in H ₂ O |

6.2.11. Antibiotika

| | |
|-------------------------------------|---------------------------------|
| Ampicillin-Stammlösung (1000 x) | 100 mg / ml in H ₂ O |
| Kanamycin-Stammlösung (1000 x) | 50 mg / ml in H ₂ O |
| Chloramphenicol-Stammlösung(1000 x) | 34 mg / ml in H ₂ O |
| Tetracyclin-Stammlösung (1000 x) | 12,5 mg / ml in Ethanol |
| Penicillin / Streptomycin | |

6.2.12. Puffer für den Löslichkeitstest von Proteinen

| | |
|----------|--|
| Puffer 1 | 1 x PBS + 0,1 % Triton X-100 |
| Puffer 2 | 1 x PBS + 0,1 % Tween 20 |
| Puffer 3 | 1 x PBS + 0,1 % SDS |
| Puffer 4 | 0,3 M NaCl + 0,05 M NaH ₂ PO ₄ + 0,01 M Imidazol, pH 8.0 |

| | |
|----------|--|
| Puffer 5 | 8 M Harnstoff + 0,1 M NaH ₂ PO ₄ + 0,01 M TRIS-HCl, pH 8.0 |
| Puffer 6 | 0,05 M TRIS-HCl + 0,002 M EDTA + 0,1 % Triton X-100 |

6.2.13. Puffer für die Proteinaufreinigung

Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen

| | |
|------------------|--|
| Lysispuffer | 8 M Harnstoff + 0,1 M NaH ₂ PO ₄ + 0,01 M TRIS-HCl, pH 8.0 |
| Waschpuffer A | 8 M Harnstoff + 0,1 M NaH ₂ PO ₄ + 0,01 M TRIS-HCl, pH 6.3 |
| Waschpuffer B | 8 M Harnstoff + 0,1 M NaH ₂ PO ₄ + 0,01 M TRIS-HCl, pH 5.9 |
| Eluierungspuffer | 8 M Harnstoff + 0,1 M NaH ₂ PO ₄ + 0,01 M TRIS-HCl, pH 4.5 |

Aufreinigung unter nicht denaturierenden Bedingungen

| | |
|------------------|--|
| Lysispuffer | 0,3 M NaCl + 0,05 M NaH ₂ PO ₄ + 0,01 M Imidazol, pH 8.0 |
| Waschpuffer | 0,3 M NaCl + 0,05 M NaH ₂ PO ₄ + 0,02 M Imidazol, pH 8.0 |
| Eluierungspuffer | 0,3 M NaCl + 0,05 M NaH ₂ PO ₄ + 0,25 M Imidazol, pH 8.0 |

Aufreinigung mit PBS / Triton X-100

| | |
|------------------|---|
| Lysispuffer | 1 x PBS + 0,5 M NaCl + 0,1 % Triton X-100, pH 8.0 |
| Waschpuffer | 1 x PBS + 0,5 M NaCl + 0,1 % Triton X-100, pH 5.9 |
| Eluierungspuffer | 1 x PBS + 0,5 M NaCl + 0,1 % Triton X-100, pH 4.5 |

6.2.14. Lösungen für SDS-Polycrylamidgele

Acrylamid-Gebrauchslösungen

| | Sammelgel 4 % | Trenngel 16 % |
|------------------------|---------------|---------------|
| Acrylamidlösung (30 %) | 1,35 ml | 5,3 ml |
| H ₂ O | 6 ml | 2 ml |
| 0,5 M TRIS-HCl, pH 6.8 | 2,5 ml | - |
| 1,5 M TRIS-HCl, pH 8.8 | - | 2,5 ml |
| SDS 10 % | 100 µl | 100 µl |
| TEMED | 10 µl | 5 µl |
| APS 10 % | 100 µl | 100 µl |

APS

10 % in H₂O

| | |
|----------------------|---|
| 2 x SDS-Probenpuffer | 20 % Glycerin 4 % SDS 1,5 % Bromphenolblau 0,125 M TRIS-HCl, pH 6.8 10 % β -Mercaptoethanol |
| Färbelösung | 0,002 M PMSF 20 % Ethanol 10 % Essigsäure 0,1 % Coomassie Blau R-250 |
| Entfärbelösung | 20 % Ethanol 10 % Essigsäure |

6.2.15. Lösungen für Proteintransfer und Western-Blot

| | |
|--|--|
| Transferpuffer | 0,05 M TRIS-HCl 0,38 M Glycin 0,1 % SDS 20 % Methanol |
| 10 x TBS | 1 M NaCl 0,05 M Tris-HCl pH 7.4 |
| BSA / TBS Peroxidase-Substratlösung | 3 % BSA in TBS 10 ml TBS 600 μ l 0,3 % Chlornaphtol 5 μ l 30 % H_2O_2 |

6.2.16. Puffer für ELISA

| | |
|------------------------|--|
| Beschichtungspuffer | 0,2 M Carbonatpuffer, pH 9.0 |
| Blockierungspuffer | 3 % BSA in PBS |
| Waschpuffer | 1 x PBS 0,025 % Tween 20 |
| TMB-Substratlösung | 1 mg TMB 5 ml 0,1 M Phosphat-Zitrat-Puffer 2 μ l 30 % H_2O_2 |
| Phosphat-Zitrat-Puffer | 25,7 ml 2 M Na_2HPO_4 24,3 ml 1 M Zitronensäure |
| Stoplösung | 1 M H_2SO_4 |

6.2.17. Antikörper und Konjugate

| | |
|--|------------------|
| Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit-Ak | Dianova, Hamburg |
| Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse-Ak | Dianova, Hamburg |
| Anti-6HIS-Tag | Dianova, Hamburg |

6.2.18. Puffer und Lösungen für die Inhibitionsstudien von Cysteinproteinasen

| | |
|--------------------------|---|
| Papain-Probenpuffer | 0,2 M K_2HPO_4 0,2 M KH_2PO_4 0,004 M EDTA 0,004 M DTT 0,01 % Brij 35 pH 6.8 |
| Cathepsin B-Probenpuffer | 0,013 M K_2HPO_4 0,087 M KH_2PO_4 0,005 M EDTA 0,005 M DTT 0,01 % Brij 35 pH 6.0 |
| Cathepsin L-Probenpuffer | 0,34 M Na-Acetat 0,06 M Essigsäure 0,004 M EDTA 0,008 M DTT 0,1 % Brij 35 pH 5.5 |
| Cathepsin S-Probenpuffer | 0,352 M KH_2PO_4 0,2 M Na_2HPO_4 0,004 M EDTA 0,008 M DTT 0,1 % Brij 35 pH 6.0 |

Cysteinproteinasen-Arbeitslösungen

| | |
|-------------|---------------|
| Papain | 0,223 mU / ml |
| Cathepsin B | 117 nM |
| Cathepsin L | 0,095 mU / ml |
| Cathepsin S | 5,25 nM |

Substrat-Stammlösungen

| | |
|-------------------|----------------|
| Z-Val-Val-Arg-AMC | 0,01 M in DMSO |
| Z-Phe-Arg-AMC | 0,01 M in DMSO |
| Z-Arg-Arg-AMC | 0,01 M in DMSO |
| Z-Phe-Arg-AMC | 0,01 M in DMSO |

Substrat-Arbeitslösungen

| | |
|-------------------|-----------------------|
| Z-Val-Val-Arg-AMC | 10 µM in Probenpuffer |
| Z-Phe-Arg-AMC | 10 µM in Probenpuffer |
| Z-Arg-Arg-AMC | 10 µM in Probenpuffer |
| Z-Phe-Arg-AMC | 10 µM in Probenpuffer |

6.2.19. Medien für die Zellkultur

| | |
|---------------------------------------|---|
| 1 x PBS | 0,1369 M NaCl |
| | 0,0027 M KCl |
| | 0,0081 M Na ₂ HPO ₄ |
| | 0,0015 M KH ₂ PO ₄ |
| | pH 7.4 |
| RPMI komplett | RPMI 1640 |
| | 0,002 M L-Glutamin |
| | 100 U / ml Penicillin |
| | 100 µg / ml Streptomycin |
| | 5 % hitzeinaktiviertes FCS |
| anti-CD3-Ak-Arbeitslösung | 200 ng / ml |
| PPD-Arbeitslösung | 10 IE / ml |
| ConA-Arbeitslösung | 2 µg / ml |
| OvA-Arbeitslösung | 880 µg / ml |
| ³ H-Thymidin-Arbeitslösung | 50 µCi / ml |
| Erythrozytenlyselösung | 90 ml 0,16 M NH ₄ Cl |
| | 10 ml 0,17 M TRIS-HCl |
| | pH 7.6 |

6.2.20. Adjuvantien

| | |
|---------|------------------------|
| 1 x STP | 1 x PBS |
| | 10 % Squalane |
| | 0,4 % Tween 80 |
| | 1,0 % Synperonic L 101 |

6.2.21. Injektionspuffer für *C. elegans*

| | |
|----------------------|---------------------------------|
| 6 x Injektionspuffer | 40 mM KPO ₄ , pH 7.5 |
| | 6 mM Kaliumcitrat, pH 7.5 |
| | 4 % PEG 6000 |

6.2.22. Tiere

BALB/c-Mäuse
OvA-Mäuse
Kaninchen
C. elegans

H-2^d Haplotyp

Wildtyp N2 (var Bristol)

BGVV, Berlin
Dr. Kamradt, DRFZ Berlin
BGVV, Berlin
Caenorhabditis genetic centre, USA