

3 Material und Methoden

3.1. Material

Chemikalien:

Amersham Pharmacia, Schweden: Agarose, ECL-Detektionssystem

Bio-Rad, München: TEMED

Boehringer, Mannheim: Ethidiumbromid, Sodiumdodecylsulfat (SDS), Taq Polymerase

FMC, Rockland, USA: Sea Plaque[®] Agarose

Gibco (Life technologies) /BRL, Berlin: 2-YT-Bouillion, Select Pepton, Agar, PBS mit Ca²⁺ und Mg²⁺, vorgefärbter Molekulargewichtsmarker

Hybaid: Qualex Gold Agarose

Merck, Darmstadt: Bromphenolblau, Blue Dextran, Serva Blue G, Mercaptoethanol

Sigma, Deisenhofen: Ammoniumpersulfat (APS), Antibiotika: Ampicillin, Gentamycin,

Kanamycin, EDTA, Ethidiumbromid, IPTG, Lipide, Salicylat, Protein A-Agarose

Qiagen, Hilden: Ni²⁺-NTA-Agarose, spin columns, Triton X-100

Die verwendeten Lösungsmittel, Säuren und Basen wie auch die verwendeten Salze und alle nicht im einzelnen aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Roth, Karlsruhe, bezogen.

Zellkultur:

Boehringer, Ingelheim: RPMI 1640, DMEM

Falcon: Blaudeckelröhrchen

Merck, Darmstadt: Dimethylsulfoxid (DMSO)

Nunc, Wiesbaden: Gewebekulturflaschen, Kryoröhrchen, 24-well-Platten, Petrischalen

Sigma, Deisenhofen: Trypsin-EDTA-Lösung (10fach konzentriert)

Zelllinien:

CVI Nierenzelllinie aus der afrikanischen grünen Meerkatze

CHO KI Ovarialzellen des chinesischen Hamsters

KnI , KnII Primärkultur von hyalinen Knorpelzellen der Hunde:

KnI: euthanasierter Rottweilerwelpen

KnII: Irish Setter, 5 Jahre

Bakterienstämme:

Escherichia coli YL 10

Gene, Plasmide:

pEGFP-cIL-4	Clontech, Heidelberg, WONDIMU et al., 2001
pEGFP-C1	Clontech, Heidelberg
pcDNA3.1-cIL-4 Myc-His(+) (Klon C2 u.C3)	Invitrogen, Karlsruhe, WONDIMU et al., 2001
pQE-30-cIL4	Qiagen, Hilden, WONDIMU et al., 2001

Transfektion:

AGS, Heidelberg: TriStar RNA Extraktionsreagenz
 Gibco (life technologies): LipofectAMINE PLUS™-Reagenz
 Greiner: Rundbodenmikrotiterplatte
 Falcon : Rotdeckelröhrchen
 Marienfeld, Deutschland: Glasplättchen

PCR:

Boehringer, Mannheim: Taq Polymerase, dNTP mix, Desoxynucleosid Triphosphat, Oligo-dT 15
 Primer
 Gibco-BRL : AMV (avian reverse transcriptase)
 Life technologies, Eggenstein: 3'- und 5'-RACE kit
 New England Biolabs, Schwalbach: Restriktionsenzyme
 Promega, Mannheim: Ribonucleaseinhibitor
 Stratagene: *Pfu* DNA Polymerase
 Qiagen, Hilden: Qiagen Plasmid Kit

ELISA:

BD Pharmingen: Alkaline Phosphatase (AKP)-conjugated Rat Anti-mouse IgG1, IgG2a, IgG2b,
 IgG3-monoklonal antibody, Streptavidin-Horseradish-Peroxidase (Sav-HRP) conjugate
 Caltag, Old Bayshore: Streptavidin enzyme conjugates
 Dianova, Hamburg: Peroxidase-conjugated Affini-Pure Rabbit-Anti-mouse-IgG (H+L)
 SIGMA, Saint Louis: Rb-Anti-mouse-Biotin-conjugate, Mouse IgG1, Kappa (MOPC-31c),
 Mouse IgG2a, κ (UPC-10), Mouse IgG2b, κ (MOPC-141), Mouse IgG3, κ (FLOPC-21) Standard
 für ELISA, Phosphatase-Substrat (pNitrophenyl Phosphate Disodium)
 NUNC, Roskilde, Denmark: ELISA-Platten (Maxisorp)

Geräte, Dokumentation:

Bachhofer: Tischzentrifuge 1000 mit Rotor 1412 (TZ)

Beckman: Ultrazentrifuge L7-65 Rotor Ti 45, SW 28, Ultrazentrifuge TL-100, Rotor TLA 100.2/100.3

Biometra, Göttingen: Elektrophorese-Apparaturen mit Kammern für SDS-PAGE und Agarosegelelektrophorese, Transilluminator für Agarosegele TFL-20M, Bakterienschüttler, Fastblotter, Gelrockner 543, Stromquellen

Eppendorf, Hamburg: Tischzentrifuge 541712, Thermomixer 5436

Hund: Lichtmikroskop Wilovert S

Janke & Kunkel IKA-Labortechnik VF2: Vortex

Kappa Messtechnik, Gleichen: KAPA CF 8/1 RCC9 Digitalkamera

Knick: PH-Meter 761 calimatic

Microson ultrasonic cell disruptor (USA)

Millipore S.A., Molsheim: MilliPORE ultra pure water system

Pharmacia: Photometer Ultrospec

Tecan: ELISA-Reader: Tecan Microplate-Reader, Microplate-Washer

Zeiss: Fluoreszenzmikroskop Axiovert 100 mit Zubehör (blauer Filtersatz: Anregungsfilter BP 450-490, Sperrfilter LP 520; grüner Filtersatz: Anregungsfilter BP 510-560, Sperrfilter LP 590; Objektiv 40x/ =0.60 Korr Achroplan

Verbrauchsmaterialien:

Eppendorf, Hamburg: Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen

Greiner, Frickenhausen: Zellkulturschalen- und Flaschen, Polystyrolröhrchen, Pasteurpipetten, Nitrozellulosemembran, Whatman-Papier

Roth, Karlsruhe: Dialyseschläuche

Sigma, Deisenhofen: Kodak-Röntgenfilme

3.2. Methoden

3.2.1. Herstellung kompetenter *Escherichia coli* (*E.coli*)

Für die Einschleusung von Plasmiden in *E.coli* stehen diverse Methoden zur Verfügung, von denen hier die Kalziumchlorid-Methode (MANDEL u. HIGA, 1970; MANIATIS et al., 1982) Verwendung fand. Dazu wurden 200 ml YT-Medium (31 g YT-Bouillon in 1 l Aqua bidest.,

autoklaviert) mit 20 µl einer YL 109-Stammkultur (Übernachtskultur) beimpft und 2-3 h bei 37°C und 200 UpM geschüttelt. Die Zellen (OD 600 nm von 0,7) befanden sich nun in einer exponentiellen Wachstumsphase; sie wurden dann 30 min auf Eis gekühlt und bei 1000 g und 4°C 15 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 50 ml eiskalter, steril filtrierter CaCl₂-Lösung (50 mM) resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden erneut, wie oben beschrieben, abzentrifugiert und in einem Endvolumen von 5 ml eiskalter CaCl₂-Lösung aufgenommen. Eine weitere Inkubation der Bakteriensuspension bei 4°C über Nacht erhöhte die Transformationskapazität (DAGERT u. EHRLICH, 1979).

3.2.2. Transformation der Bakterien

Die Aufnahme des Plasmids in die kompetenten Bakterienzellen erfolgte während eines Hitzeschocks. 10 ng Plasmid-DNA wurden mit 200 µl kompetenten Zellen 40 min auf Eis inkubiert, dann für 45 sek in ein 42°C heißes Wasserbad gestellt und anschließend erneut 10 min auf Eis gekühlt. Als die Bakteriensuspension wieder Raumtemperatur erreicht hatte, wurde sie für eine Stunde mit 3 ml YT-Medium bei 37°C und 200 UpM geschüttelt. Erfolgreich transformierte Bakterien bildeten in dieser Zeit die plasmidkodierte Kanamycinresistenz aus. Eine Agarplatte mit YT-Nährmedium und Antibiotikum wurde mit 150 µl des Transformationsansatzes beimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.3. Isolierung der Plasmid-DNA aus E.coli

Nach 16 h konnten von den Kolonien auf den Agarplatten Flüssigkulturen beimpft werden. Dazu wurden mit einem sterilen Zahnstocher einige Bakterien einer Kolonie in 3 ml YT-Medium mit Kanamycin (50 µg/ml) überführt und auf dem Schüttler bei 37°C für 16 h vermehrt.

Aus 1,5 ml dieser Kultur erfolgte die Minipräparation der Plasmide nach einem Protokoll von DEL SAL et al. (1988).

Die Bakterien wurden zunächst in einem Eppendorfgefäß abzentrifugiert (5 min bei 20.000 g) und in 200 µl STET-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 8% Sucrose, 0,1% Triton X-100, 50 mM EDTA) resuspendiert. Nach Zugabe von 4 µl Lysozym (50mg/ml) wurden die Bakterien durch 45 sek Kochen im Wasserbad vollständig zerstört. Die Zellwandtrümmer inklusive daran anhaftender bakterieller DNA konnten nach Zentrifugation (Beckman-Ultrazentrifuge: 20.000 g, 10 min bei RT) mit einem sterilen Zahnstocher entfernt werden. Durch Zugabe von 8 µl 37°C warmem Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB 5%) fiel die Plasmid-DNA aus und wurde bei

20.000 g 5 min in der Beckman-Ultrazentrifuge zentrifugiert. Durch Resuspendieren des Pellets in 300 µl 1,2 M NaCl-Lösung wurde der DNA-CTAB-Komplex wieder gelöst. Die DNA konnte durch Zugabe von 750 µl eiskaltem Ethanol gefällt werden. Nach Abzentrifugieren, Waschen mit 750 µl eiskaltem 70% Ethanol und erneutem Pelletieren wurde die DNA bei 37°C getrocknet und in 40 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) mit RNase (20 mg/ml) resuspendiert. Die Lagerung der so präparierten DNA erfolgte bei -20°C.

Größere Mengen DNA konnten aus 100 ml-Kulturen gewonnen werden. Dazu wurden zunächst 100 ml YT-Medium (mit Kanamycin) mit 150 µl der 3 ml-Kultur inokuliert und über Nacht, wie vorher beschrieben, inkubiert. Die DNA wurde dann mit einem kommerziell erhältlichen Kit der Firma QIAGEN auf der Basis von DNA-bindenden Anionen-Austauscher-Säulen präpariert. Dabei erfolgte die Lyse der Bakterien in einem alkalischen Puffer. Kontaminierende Bestandteile der Lysate wie Proteine wurden durch Waschen mit 1 M NaCl-haltigem Puffer entfernt und die DNA durch Zugabe eines Puffers mit pH 8,5 und 1,25 M NaCl wieder von der Matrix eluiert. Zum Entsalzen erfolgte ein Waschen der DNA zunächst mit Isopropanol, dann mit Ethanol. Die zum Pelletieren der DNA notwendige Zentrifugation wurde in der Beckman-Ultrazentrifuge bei 20.000 g für 30 min durchgeführt. Nach Trocknen des Pellets konnte die DNA in 300 µl TE-Puffer resuspendiert werden.

3.2.4. Restriktionsverdau

Um doppelsträngige DNA spezifisch zu schneiden, kamen Restriktionsenzyme (*Eco RI*+ *Xba I*) und dazugehörige Reaktionspuffer der Firma New England Biolabs (Schwalbach) zur Anwendung. Zunächst erfolgte eine Konzentrationsbestimmung der in TE-Puffer suspendierten DNA im Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die DNA-Menge wurde nach der Formel

$$\text{DNA-Konzentration } (\mu\text{g/ml}) = \text{OD} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

berechnet und anschließend je µg DNA eine Einheit Enzym eingesetzt. Für die Reaktion wurde die DNA mit dem enzyspezifischen Reaktionspuffer (zehnfach) und einer entsprechenden Menge Enzym für eine Stunde im 37°C Wasserbad inkubiert.

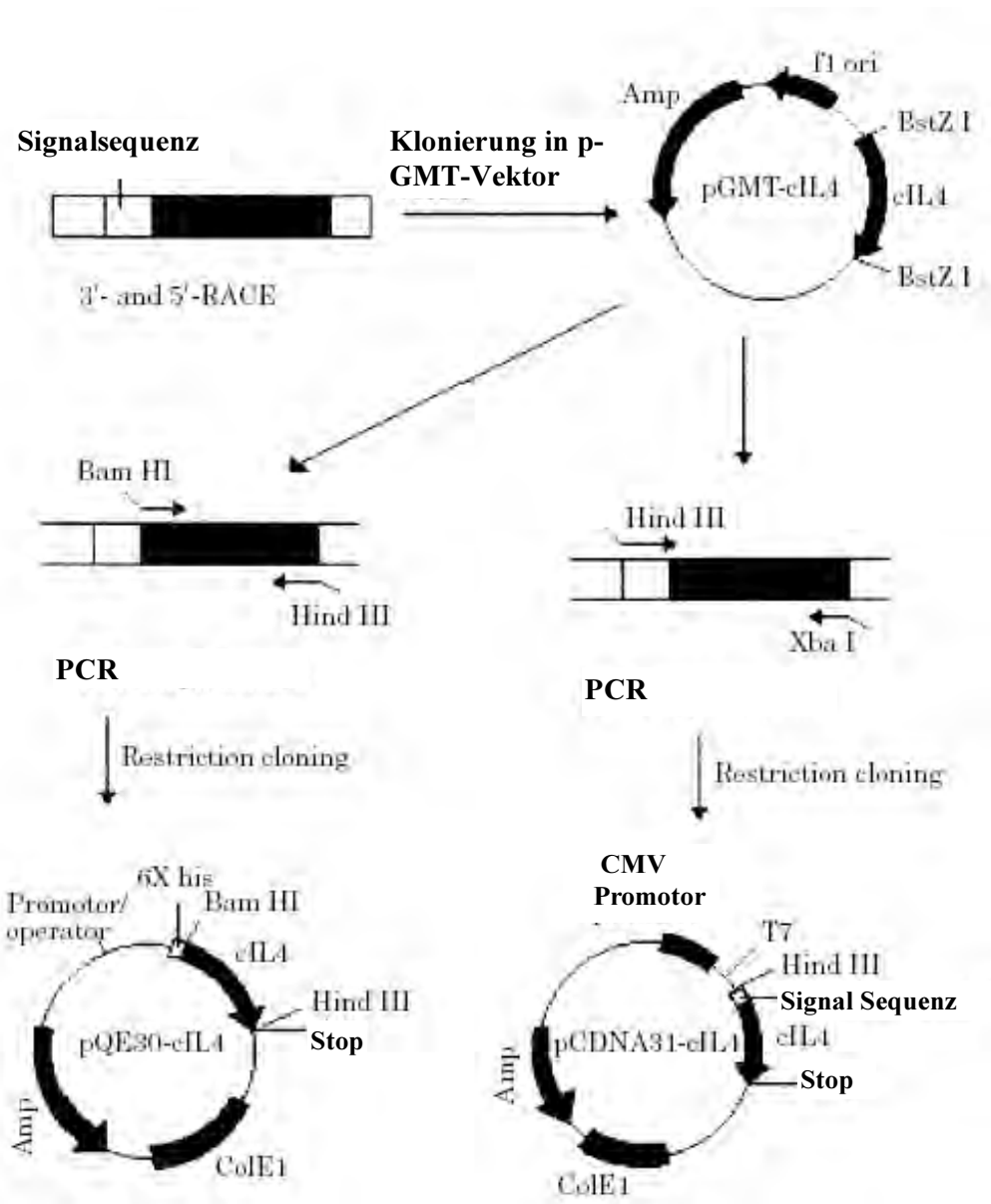
3.2.5. Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung der Gemische an DNA-Fragmenten erfolgte in 1% Agarosegelen. Für deren Herstellung wurde zu je 10 mg Agarose (Pharmacia, Schweden), 1 ml TAE-Puffer (1 mM EDTA, 200 mM Essigsäure, 40 mM Tris-HCl) mit 1 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben und der Ansatz so lange gekocht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Die abgekühlte, aber noch flüssige Agaroselösung wurde in die vorbereitete Gelkammer (Biometra, Göttingen) gegossen. Die DNA-Proben wurden im Verhältnis 1:5 mit Stopplösung (73 mM Sucrose, 100 mM Tris-HCl, 63 mM EDTA, 1% Bromphenolblau, pH 7,6) versetzt. Nach Erstarren der Agarose und Einsetzen in die Laufvorrichtung wurden die so vorbereiteten DNA-Proben in die Geltaschen geladen. Die Elektrophorese (45 min, 90 Volt) erfolgte ebenfalls in TAE-Puffer mit Ethidiumbromid. Die DNA-Banden konnten unter UV-Licht (302 nm) sichtbar gemacht werden. Die Größe wurde durch Vergleich mit dem im selben Gel aufgetrennten DNA-λ-Markern ermittelt.

3.2.6. Klonierung der caninen IL-4 cDNA und Isolierung des caninen IL-4 Proteins

Das Gen von IL-4 aus Hunden war zu dem Zeitpunkt, als unser Institut sich diesem Aufgabenfeld zugewandt hatte, noch nicht verfügbar und mußte deshalb kloniert werden. Dazu wurde aus caninen Monozyten (PBMC) die gesamte RNA extrahiert und mittels der Rapid-Amplification-of-cDNA-ends (RACE)-PCR-Technik die dem IL-4-Gen entsprechende cDNA ermittelt. Die Ergebnisse der Einzelschritte sind detailliert in der Dissertation von WONDIMU (2002) dargestellt.

Zur Klonierung der PCR-Fragmente wurde der pGEM-Plasmidvektor von Promega verwendet. Nach wiederholtem Screening und wiederholter Plasmidreinigung konnte die gesamte kodierende Sequenz ermittelt werden. Das klonierte IL-4 des Hundes ist ein Glykoprotein, das von einem Gen mit 399 Basenpaaren codiert wird. Die Aminosäuresequenz stimmt mit dem IL-4 des Menschen zu 40% überein (WONDIMU et al., 2001).



WONDIMU et al., Cytokine, 2001 Nov, 16(3):88-92

Abb.3: Das canine IL-4 wurde von Wondimu, A., mittels des RACE-Systems amplifiziert und in einen pGMT-Vektor einkloniert. Von diesem Klon wurden mit Hilfe der PCR und der Restriktionsklonierung zwei Expressionsklone hergestellt. pQE30-cIL-4 diente der Expression in Bakterienzellen und pCDNA3.1-cIL-4 der Expression in Säugerzellen.

Zur methodischen Etablierung der Expression in Knorpelzellen wurden zunächst CHO-Zellen (Chinese-hamster-ovarial-cells) verwandt, die schnell und leicht anzuzüchten sind und eine stabile Expression des IL-4 ermöglichen.

3.2.7. Produktion von IL-4 in E.coli

Ein Liter YT-Medium, angereichert mit 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin, wurde mit 20 ml einer Übernacht-Startkultur (mit dem Expressionsplasmid pQE30-cIL-4 transformierte *E. coli* M15 [pREP-4]) beimpft und auf dem Schüttler bei 37°C inkubiert. Die Induktion mit 1 mM IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid) erfolgte bei einer OD von 0,7 bei 600 nm. Danach wurde für weitere 4-5 h inkubiert. Pelletiert wurden die Zellen bei 13.000 g für 10 min (JS 25, Beckman, USA), danach wurden sie mit PBS einmal gewaschen, auf Eis gestellt und in Ultraschall-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% Glycol, 1 mM PMSF (Phenylmethylsulfonyl-Fluorid)) resuspendiert. Lysiert wurden die Zellen mit dem Microson Ultra-Cell-Disruptor (Misonix, USA) 6 x 10 sek auf Eis mit jeweils 10 sek Pause. Nach der erneuten Zentrifugation bei 25.000 g für 15 min bei 4°C wurde das Pellet, was schließlich die Einschlusskörperchen enthielt, in Guanidin-Puffer (6 m Guanidin-HCl, 50 mM Tris-HCL, pH 8,5, 10% Glycerol, 1 mM PMSF, 2 mM reduziertes und 0,2 mM oxidiertes Glutathion) unter leichtem Rühren für 1 h gelöst. Für jedes 1 g schwere Pellet wurden 9 ml Guanidin-Puffer verwandt.

Die Renaturierung der denaturierten Proteine erfolgte durch die Verdünnung in Anwesenheit von Thiol-Reagenzien (WINGFIELD et al., 1995).

Die Renaturierung wurde eingeleitet, indem die Lösung, die die Einschlusskörperchen enthielt, schrittweise mit Verdünnungspuffer (50 mM Tris-HCL, pH 8,0, 10% Glycerol, 2 mM reduziertes und 0,2 mM oxidiertes Glutathion, 1 mM PMSF) verdünnt und für 4 h bei Raumtemperatur inkubiert wurde.

3.2.8. Reinigung von His-tagged caninem IL-4

Um Präzipitate, die beim Verdünnungsprozeß entstanden sind, zu entfernen, wurde das unfertige Extrakt bei 25.000 g für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Verdünnungspuffer verdünnter Ni-NTA (Nickel-Nitrilotriacetic-Säure) gemischt. Anschließend wurde Imidazol in einer Konzentration von 10 mM hinzugegeben und für 2 h unter leichtem Schütteln inkubiert.

Danach wurde die Lösung auf eine Säule aufgetragen und mit dem zehnfachen Säulenvolumen an Waschpuffer (50 mM Sodium Phosphat, pH 8,0, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 10% Glycerol,

5 mM β -Mercaptoethanol) gewaschen. Danach erfolgten noch einmal Waschungen mit dem zehnfachen Säulenvolumen, mit demselben Puffer angereichert zuzüglich 50 mM Imidazol, in manchen Fällen auch 80 mM Imidazol. Eluiert wurde das gereinigte His-tagged IL-4 schlußendlich mit einem Waschpuffer mit der Imidazolkonzentration von 250 mM. Anschließend erfolgte die Dialyse gegen PBS (WONDIMU et al., 2001).

3.2.9. Überprüfung der Bioaktivität von IL-4

Das aus E.coli gereinigte Protein war funktionell aktiv. Der Nachweis gelang mit Hilfe eines Bioassays, basierend auf caninen T-Lymphoblasten. Die radioaktive Markierung in diesem Proliferationstest erfolgte mit ^3H -Thymidin. Im Test konnte nach Expression des IL-4 eine deutliche und spezifische Steigerung der Proliferation beobachtet werden (WONDIMU et al., 2001).

3.2.10. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Konzentration der gereinigten Proteine erfolgte nach der Methode von Bradford (BRADFORD, 1976). Als Standard wurden jeweils zweimal 50 μl der Probe in geeigneter Verdünnung und 100 μl der Bradford-Lösung (100 mg Serva Blau G, 50 ml Ethanol (96%), 100 ml Phosphorsäure (85%), auf 1 l mit aqua bidest aufgefüllt) in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Die Eichkurve wurde mit Proteinlösungen von Rinderserumalbumin (BSA) unterschiedlicher Konzentrationen erstellt. Die Absorption der Proben wurde nach 5 min bei 620 nm in einem ELISA-Reader gemessen und die Messwerte mit Hilfe des Wincurvefitting-Programmes am Computer ausgewertet.

3.2.11. Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Prinzip:

Für die SDS-Elektrophorese ist die Arbeitsvorschrift von LÄMMLI (1970) Standard geworden und wird in den meisten Fällen unverändert angewandt. Durch die SDS-Behandlung von Proteinen werden individuelle Ladungsunterschiede überdeckt, Wasserstoffbrückenbindungen gespalten, hydrophobe Wechselwirkungen aufgehoben, die Aggregatbildung von Proteinen verhindert sowie die Polypeptidfäden gestreckt und zu Mizellen geformt. Alle Mizellen erhalten eine negative Ladung, die proportional zur Masse ist. Da die Radien dieser Mizellen auch

proportional zum Molekulargewicht sind, erhält man bei der Elektrophorese eine Auftrennung entsprechend der Molekulargewichte.

Im Sammelgel ist die Mobilität der Proteine ausschließlich durch die Ladung bestimmt. So werden die Proteine in Zonen gleicher Ladung gewissermaßen vorsortiert. Beim Auftreffen auf das engporige Trenngel werden die Proteine retardiert, und es bildet sich ein Proteinstau. Die Mobilität ist jetzt von der Ladung und der Molekülgröße abhängig.

Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgte mit Hilfe der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit dem diskontinuierlichen Gelsystem nach LAEMMLI (1970). Es wurden Sammelgele von 5% und Trenngele von 15% Acrylamid/Bisacrylamid verwendet.

Die Proben wurden mit reduzierendem Probenpuffer versetzt (31,25 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10% Glycerin, 3% SDS, 0,5% Bromphenolblau, 5% Mercaptoethanol), kurz aufgekocht und störende Feststoffe durch Zentrifugation (TZ, 14.000 UpM, 5 min) entfernt.

Zusätzlich zu den Proben lief ein Proteinmarker mit, um die Proteingrößen bestimmen zu können.

Die Banden wurden anhand der Coomassie-Brillant-Blue- (1 g/l in 50% Methanol, 10% Essigsäure) und der Silber-Färbung (BLUM et al., 1987) dargestellt, im Gel fixiert (10% Methanol, 10% Essigsäure) und auf Whatmann-Papier getrocknet.

3.2.12. Färbung nach Coomassie

Die unspezifische Färbung aller aufgetrennten Proteine erfolgte mit Coomassie-Blau. Das Trenngel wurde direkt nach der Elektrophorese zwei Stunden in der Färbelösung (1g Coomassieblau in 1l Entfärberlösung, s.u.) inkubiert. Durch Schwenken für 18-24 h in Entfärberlösung (10% Methanol, 10% Essigsäure in A. bidest.) wurde das Gel wieder transparent; nur die Proteinbanden blieben blau und wurden dadurch sichtbar.

3.2.13. Westernblot

Im Westernblot wurden die Proteinbanden aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine präparierte Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) transferiert (10 sek Methanol, 5 min aqua bidest., 15 min Transferpuffer) und somit fixiert. Dieser Transfer erfolgte in einer Blotkammer der Firma Biometra mit Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol) innerhalb 30 min bei 25 mA pro cm² Gelfläche. Als Kontrolle für die Vollständigkeit des Transfers diente ein ebenfalls im Gel aufgetrennter vorgefärbter Marker. Die PVDF-Membran

wurde für 1 h mit Blot-Puffer (20% Magermilchpulver in PBS und 0,1% Tween20) abgesättigt. Die einzelnen Banden wurden separiert und dann 1 h mit verschiedenen Konzentrationen an Anti-IL-4-Antikörper (Kaninchen), verdünnt in Blot-Waschpuffer, inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je 10 min in Blot-Waschpuffer wurde 1 h mit einem Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat (1:5000 verdünnt) inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurde mit dem ECL-System (enhanced chemiluminescence system, Amersham Pharmacia, Schweden) detektiert. Die Chemilumineszenz wurde auf einem Röntgenfilm nach unterschiedlichen Expositionszeiten sichtbar gemacht.

3.2.14. Polyklonale Antikörper

3.2.14.1. Gewinnung der polyklonalen Antikörper

Die polyklonalen Anti-rcIL-4-Antikörper wurden durch eine Auftragsimmunisierung nach Standardimmunisierungsschemata vom Kaninchen gewonnen. Das beauftragte Institut war SeQ-Lab (Sequence Laboratories, Göttingen GmbH).

Standard-Immunisierungsschema (3 Monate):

Tag	0	1.	Injektion (Präimmenserum > 5ml)
	21	2.	Injektion
	35	1.	Blutabnahme (10 - 20 ml)
	49	3.	Injektion
	63	2.	Blutabnahme (2 ml + 10 - 20 ml)
	77	4.	Injektion
	98		Entblutung (>50 ml)

Zur Immunisierung benötigtes Antigen für Kaninchen:

Form des Antigens	1. Injektion	Folgeinjektionen
Proteine > 20 kD	100 - 500 µg	100 µg
Proteine < 20 kD	250 - 500 µg	100 - 250 µg

3.2.14.2. Reinigung von IgG mittels einer Protein A-Säule

Prinzip:

Die Affinitätschromatographie ist eine Methode, mit der in nur einem Arbeitsgang spezifische Substanzen aus einer komplex zusammengesetzten Lösung in hohem Reinheitsgrad gewonnen werden können. Die zu reinigenden Moleküle (hier Kaninchen-Immunglobuline) werden

spezifisch und reversibel an eine komplementäre Substanz, den Liganden (hier Protein A), gebunden. Der Ligand ist kovalent an eine unlösliche Matrix (Sephrose) gebunden. Die Probe wurde unter besonderen Bedingungen (z.B. pH-Wert) über den an der Matrix fixierten Liganden gegeben. Spezifische Moleküle werden gebunden, alle anderen Substanzen ausgewaschen. Durch Veränderung des Puffermilieus können spezifisch gebundene Substanzen vom Liganden gelöst und in konzentrierter und reiner Form gewonnen werden.

Das Kaninchenserum (final bleeding) wurde bei 4°C über Nacht gegen den Bindungspuffer (0,1 M Tris-HCl pH 7,5, 0,15 M NaCl) dialysiert. Dafür wurden Dialyseschläuche von Roth mit einer Ausschlussgröße von 12-14 kDa verwendet, wofür diese vor der Benutzung 30 min in einer 1 mM EDTA-Lösung gekocht und anschließend gewässert wurden.

Um die Protein A-Säulen zu reinigen, wurden sie vor Gebrauch mit Elutionspuffer (0,1 M Glycin-HCl pH 2,8, 0,15 M NaCl) und danach mit Bindungspuffer gewaschen.

2ml dialysiertes Kaninchenserum wurde auf die Säule gegeben und mit dem zehnfachen Volumen Bindungspuffer gewaschen.

Die Elution der Antikörper erfolgte in 2 ml Fraktionen. Die Antikörper enthaltenden Fraktionen (E2 7,3 mg/ml, gemessen mit Bradford) wurden erneut bei 4°C über Nacht gegen PBS dialysiert.

3.2.15. Monoklonale Antikörper

3.2.15.1. Hybridomzellgewinnung

Die Methode zur Herstellung von Hybridomzellen durch somatische Hybridisierung von B-Lymphozyten und Myelomzellen kann im wesentlichen in die Abschnitte

- 1.) Immunisierung,
- 2.) Zellfusion,
- 3.) Zellselektion

unterteilt werden, deren schematischer Ablauf in folgender Abbildung wiedergegeben ist:

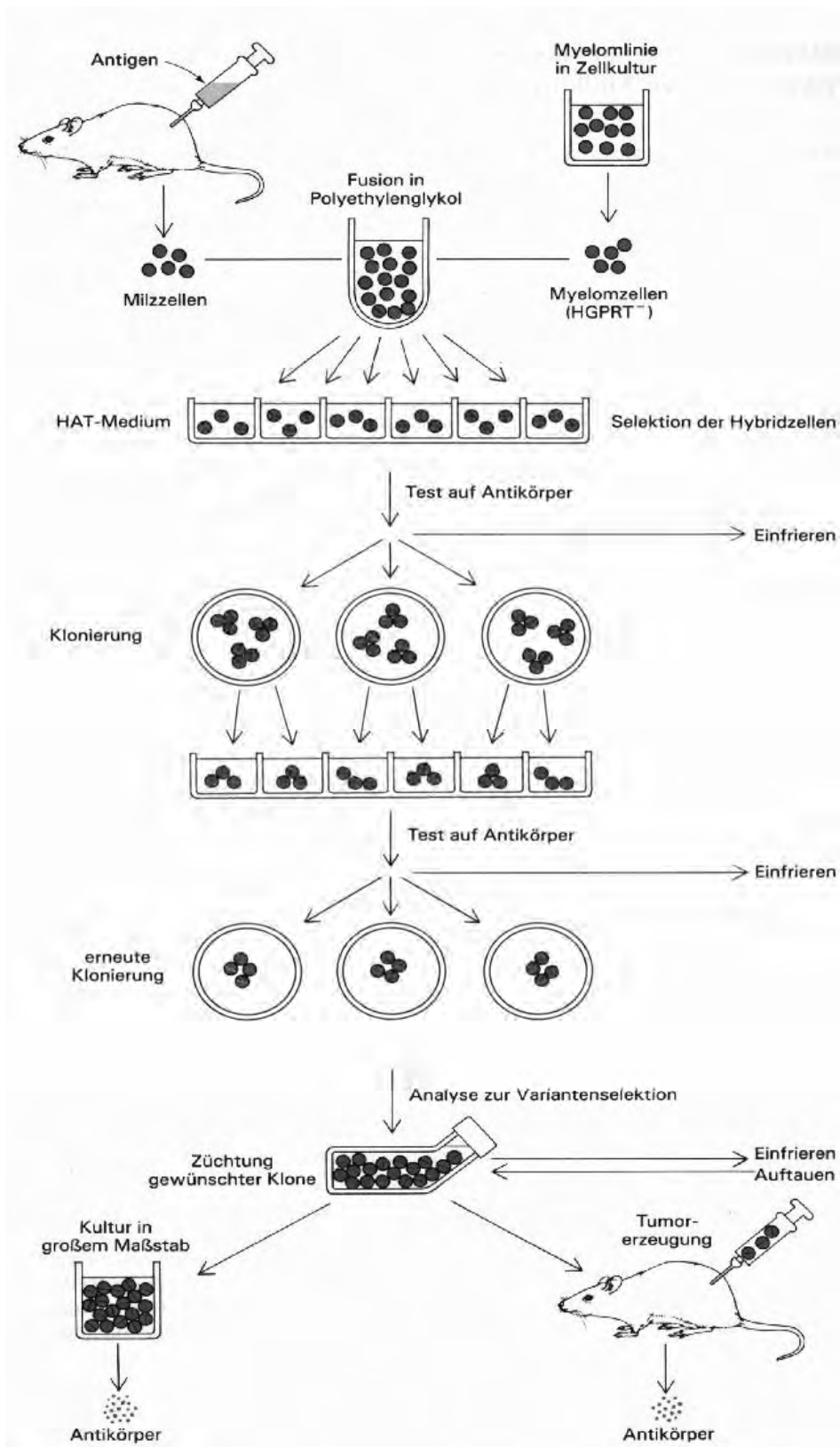


Abb.4: Herstellung monoklonaler Antikörper (MILSTEIN, 1980)

Prinzip:

Aus der Maus stammende antikörperbildende Lymphozyten lassen sich in der Zellkultur nur für wenige Wochen kultivieren und sind so nicht für die Gewinnung einer ausreichenden Menge monospezifischer Antikörper geeignet. Seit der Entwicklung der Hybridomtechnik durch KÖHLER u. MILSTEIN (1975) ist es möglich, eine genügend große Menge monoklonaler und monospezifischer Antikörper herzustellen. Hierzu werden murine Myelomzellen, die in der Zellkultur praktisch unbegrenzt vermehrbar sind, mit Lymphozyten der Maus in Polyethylenglycol-Medium (PEG) fusioniert. Die PEG-vermittelte Zellfusion wurde an Säugerzellen zum erstenmal von PONTECORVO (1975) eingesetzt. Polyethylenglycol besitzt ein hohes Dipolmoment. Diese Eigenschaft führt dazu, daß um PEG-Moleküle eine große Hydratationshülle gebildet wird. So bewirkt der Einsatz von 50-60 %-igem PEG, daß das gesamte Wasser einer Lösung mit PEG assoziiert wird. Dadurch kommt es zur Entfernung der Hydratationshülle von der Oberfläche der zu fusionierenden Zellen und zu hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Membranlipiden (KLEBE u. BENTLEY, 1987). Die Verdünnung des PEG mit dem Medium führt dann zur eigentlichen Fusion. Die dadurch entstehenden Hybridzellen besitzen beide Eigenschaften (Antikörperbildung und unbegrenzte Vermehrungsfähigkeit) in der Zellkultur. Durch Subklonierung und anschließende Vermehrung der Hybridzellen lassen sich monoklonale Antikörper in ausreichender Menge herstellen. Eine Maus wurde mehrmals mit Antigen (rekombinantes canines IL-4) immunisiert. Nach sechs Wochen erfolgte die Gewinnung des Positiv-Serums durch eine Blutentnahme. Die Milz wurde gewonnen, die Milzzellen geerntet und ebenso wie die Myelomzellen gezählt. Danach erfolgte die Fusion der Milz- und Myelomzellen unter Zugabe von 1 ml PEG für 60 sek nach mehrmaligem Waschen mit RPMI-Medium die Aussaat in HAT-Medium. Dieses Medium enthält Hypoxanthin und Thymin als Vorstufen für die Synthesewege und Aminopterin. Nicht fusionierte Zellen sterben ab, da sie kein Hypoxanthin verwenden können und Milzzellen sterben ab, da sie *in vitro* nicht proliferieren können. Es wachsen ausschließlich Hybridzellen heran, da sie fähig sind, ihre Nukleotide über den Nebenweg zu synthetisieren und den neoplastischen Charakter ihrer Myelomelternzellen zu besitzen.

3.2.15.2. Definition Myelom(zellen)

Das Myelom wird auch als Plasmozytom bezeichnet. Es ist ein vom Knochengewebe ausgehender bösartiger Tumor. Initiiert von einem Zellklon, kommt es zur Vermehrung von Plasmazellen im Knochenmark und gleichzeitiger Produktion von pathologischen Immunglobulinen ohne (Antikörper)-Funktion (in ca. 50% der Fälle IgG).

Monoklonale Antikörper sind genetisch identische Antikörper, die mit der so genannten Hybridomtechnik hergestellt werden. Entartete Lymphozyten (Myelomzellen) werden mit Antikörper bildenden Lymphozyten verschmolzen (Hybridisierung). Diese Hybridome sind fast unbegrenzt lebensfähig (immortalisiert) und bilden große Mengen des Antikörpers, auf den die Lymphozyten "programmiert" waren, der gegen eine bestimmte Antigenstruktur gerichtet war. Als Detektionsantikörper dienen mit Peroxidase- und alkalischer Phosphatase-markierte Antikörper im Vergleich.

3.2.15.3. Anzucht

Die Anzucht der Hybridomzellen erfolgte in Supermedium (RPMI+SP-Glutamin, 10% FCS, 1% Hypoxanthin-Thymidin, 10% Conimed, 1% Pyruvat, 2% IL-6) auf „Feeder“-Zellplatten (Mikrotiterplatten, mit Peritonealmakrophagen der Maus besetzt).

3.2.15.4. Selektion der Hybridomzellklone

Um festzustellen, welcher Klon die meisten spezifischen Antikörper produziert hat, wurden mehrere Zellkulturüberstände von verschiedenen Fusionen auf ihren spezifischen Antikörpergehalt getestet. Die Mikrotiterplatte (96-well) wurde mit 125 ng pro Vertiefung, mit rekombinantem IL-4 in PBS verdünnt, beschichtet. Danach dienten die Zellkulturüberstände, 1:2 mit PBS-Tween verdünnt, als erster Antikörper. Detektiert wurde mit einem peroxidasemarkierten Anti-Maus-Antikörper, 1:2000 verdünnt. Als Substrat diente Orthophenyldiamin (OPD).

3.2.15.5. Isotypisierung der Antikörper

Das Beschichten der Mikrotiterplatte erfolgte mit 125 ng rc-IL-4 pro Vertiefung 30 min bei RT auf dem Schüttler. Danach wurde 15 min mit Blockierungslösung (PBS, 1% bovines Serumalbumin) geblockt und dreimal mit Waschlösung (PBS, 0,1% Tween20) gewaschen. Anschließend wurden die Proben der einzelnen Zellkulturüberstände (1:2 mit PBS/Tween

verdünnt) aufgetragen und 30 min bei RT inkubiert. Danach wurde erneut dreimal gewaschen, bevor die Detektionsantikörper („mouse-monoclonal-antibody-isotyping-reagents -Kit“, SIGMA, Ziege: IgA, IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3) für 30 min bei RT binden sollten. Nach erneuter dreimaliger Wäsche erfolgte der Einsatz des mit peroxidase markierten Anti-Ziege-Antikörpers (1:5000 verdünnt) für 30 min bei RT. Nach der Waschung erfolgte die Detektion mit H₂O₂+OPD und der ELISA-Stopplösung (H₂SO₄, 1:24 verdünnt). Gemessen wurde mit dem im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 492 nm gegen 620.

3.2.16. Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) als permanente Zelllinie

Für diese Arbeit wurde - neben den Knorpelzellen - auch eine permanente Zelllinie verwendet: die CHO-Zelllinie (CHO-K1, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA, Bestellnr.: CRL-1859).

Die CHO-Zellen stammen aus dem Ovar eines chinesischen Hamsterweibchens (*Cricetulus griseus*). Diese Zellen wurden ausgewählt, da sie schnell wachsen und bei Transfektionen Plasmid-DNA mit hoher Effizienz aufnehmen können.

Die Zellen wurden in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) mit 10% fetalem Kälberserum (FKS) und 1% Penicillin/Streptomycin-Gemisch bei 37°C und einer Atmosphäre von 5% Kohlendioxid als Monolayer kultiviert. Eine Zellpassage fand alle 3-4 Tage statt. Dazu wurde das Medium abgesaugt; die Zellen mit 0,05% Trypsin und 0,02% EDTA wurden vom Boden abgelöst und in frischem Medium mit 10% FKS und 1% Pen/Strep resuspendiert.

3.2.17. Knorpelzellen

Um welchen Knorpeltyp es sich auch handelt, die Knorpelzellen sind unter physiologischen Bedingungen immer in einer Knorpelmatrix, bestehend aus Kollagen vom Typ II, IX und XI, eingebettet und stehen in engem Kontakt zu den sie umgebenden Gewebezelltypen wie Osteoblasten und Synoviozyten. Sie sind also von vielen Faktoren abhängig.

Diese Situation ist noch komplexer unter pathologischen Umständen wie z.B. einer Arthritis. Es werden viele Typen der *In-vitro*-Knorpelzellkultur beschrieben; die Monolayer-Kultur, für die ich mich entschieden habe, ist die am häufigsten benutzte. Die Vorteile dieser Art der Zellkultivierung sind die einfache Handhabung, die Adaptationsfähigkeit an eine große und kleine Anzahl von Zellen und die Leichtigkeit der Vermehrung (HANSEN et al., 1998).

Gelenkchondrozyten dedifferenzieren unter solchen Zellkulturbedingungen (Monolayerkultur bei 37°C, 20% O₂ und 5% CO₂) allerdings sehr rasch. Sie verlieren dabei ihren runden Phänotyp, werden spindelförmig und stellen ihre Kollagenproduktion von Typ II, IX und XI auf Typ I, III und V um (ELIMA u. VUORIO, 1989; FINER et al., 1985). Dieser Vorgang ist aber reversibel. Als Stimuli für eine Redifferenzierung scheinen unter anderem mechanische Beanspruchung und Sauerstoffangebot eine Rolle zu spielen (BASSET u. HERRMANN, 1961). Chondrozyten sind *in vivo* an einen sehr niedrigen Sauerstoffpartialdruck (PO₂) angepaßt (MAROUDAS, 1973), und die Ausprägung von chondrozytenartigen Eigenschaften wird bei mesenchymalen Zellen durch einen niedrigen PO₂ begünstigt (HUNTER u. CAPLAN, 1983).

3.2.17.1. Gewinnung des Knorpels und Verdau

Da es keine kommerziell erhältlichen Knorpelzelllinien des Hundes gibt, wurde zunächst versucht, Primärkulturen herzustellen, aus denen Zelllinien selektiert werden sollten.

Als Spender dienten euthanasierte Hunde aus der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin (Leitung: Prof. Dr. L. Brunnberg).

Um auf dem Gebiet der Isolierung und Kultivierung der Zellen mehr Erfahrungen zu sammeln, wurde Kontakt zu der Arbeitsgruppe von PD Dr. Michael Sittinger an der Charité aufgenommen, die sich mit Knorpelzellisolierung und mit tissue-engineering beschäftigt.

Das Knorpelmaterial KnI stammt von einem wegen Aorten- und Pulmonarstenose euthanasierten Rottweilerwelpen, acht Wochen alt, das Knorpelmaterial KnII aus einem euthanasierten 5jährigen Irish Setter.

Das Ausgangsmaterial wurde in beiden Fällen identisch entnommen und weiterbehandelt:

Der hyaline Knorpel wurde vorsichtig von dem Condylus medialis und lateralis mit dem Skalpell abgetrennt, in einem 50 ml Falcon-Röhrchen mit 30 ml HANKS-Salzlösung (w/o Ca²⁺Mg²⁺) aufgefangen und auf Eis transportiert. Die Lösung wurde abgesaugt, die abgeschälten Knorpelstücke wurden kurz mit 70% Alkohol gespült und anschließend mit PBS gründlich gewaschen. Danach wurden die Knorpelstücke in ca. 25 ml Medium (RPMI, 10% FKS, 1% Pen/Strep) aufgenommen, in eine Petrischale überführt und mittels zweier Skalpelle in gleichmäßig kleine Stückchen geschnitten. Danach wurde die Lösung wiederholt abgesaugt. Die Knorpelstückchen wurden in einen autoklavierten Erlenmeyerkolben gegeben, der 30 ml RPMI (10% FKS, 1% Pen/Strep) mit 1 ml sterilfiltriertem aliquotiertem Enzym-Cocktail (30 ml RPMI

1640, 10% FKS, 50 U Collagenase P, 15000 U Collagenase CLS II, 500 U Hyaluronidase) enthielt, und bei 37°C 17,5 h auf einem Magnetrührer verdaut.

3.2.17.2. Ermittlung der Zellzahl

Die entstandene Zellsuspension wurde durch ein Zellsieb (Porengröße: 250 µm) in ein 50 ml-Röhrchen filtriert, mit PBS aufgefüllt und 10 min bei 1800 U/min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit einer 2 ml-Spritze gut durchgemischt, mit HANKS-Lösung aufgefüllt und erneut für 5 min bei 1800 U/min zentrifugiert. Der Vorgang wurde so lange wiederholt, bis der Überstand klar war. Dann wurde das Pellet mit 10 ml Medium (RPMI, 10% FKS) resuspendiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels der Trypanblau-Methode in der Neubauerzählkammer (siehe Abb.5.).

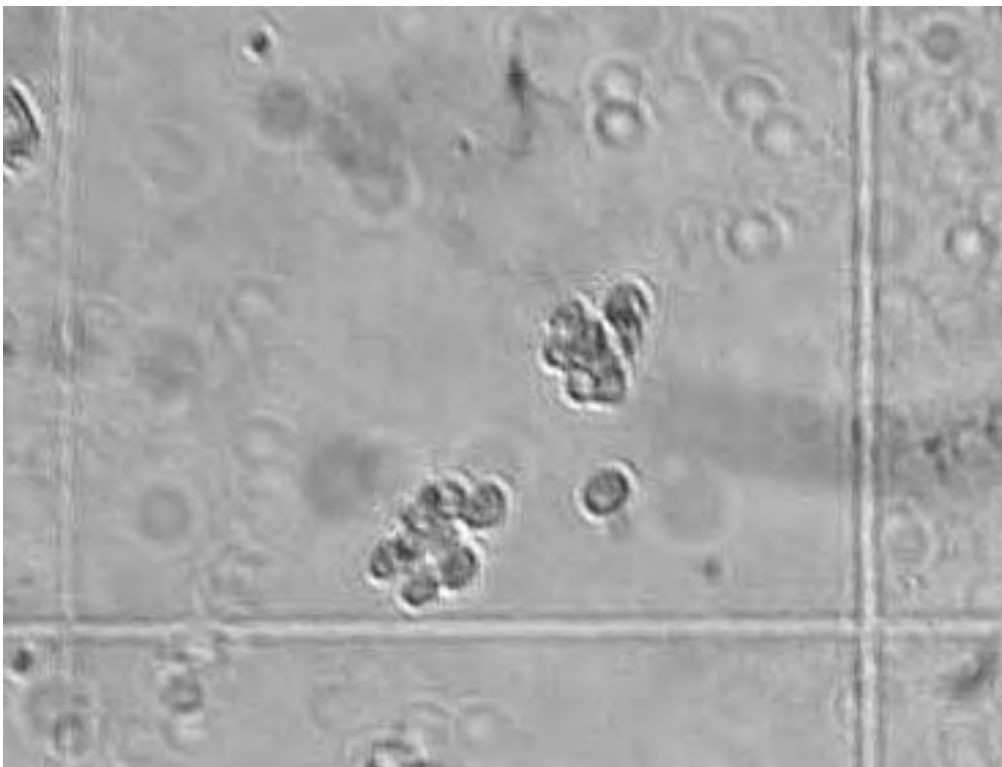


Abb.5: Knorpelzellverbände KnI in der Neubauerzählkammer, 200x vergrößert

3.2.17.3. Zellkultivierung

Die isolierten Knorpelzellen (KnI, KnII) wurden in Kulturflaschen mit einer Zelldichte von 20.000 Zellen/cm² Kulturoberfläche ausgesät und alle vier Tage mittels einer Trypsin-EDTA-Lösung passagiert.

3.2.18. Gefrierkonservierung von Zellen

Um Zellschäden durch langsame Veränderung der Eiskristalle zu minimieren, wurde den Zellen im Konservierungsmedium (RPMI, 10% FKS) 10% kryoprotektives Dimethylsulfoxid (DMSO) zugesetzt. Konfluent gewachsene Zellen wurden trypsinisiert, gezählt und 5 min bei 250 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in Konservierungsmedium resuspendiert (1×10^6 Zellen/ml) und in Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden) pipettiert. Die Proben wurden zunächst kurz auf Eis gestellt, dann für 2h bei -20°C gelagert und für 24h in einer -80°C-Gefriertruhe eingefroren, danach in flüssigem Stickstoff (-196°C) bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Die Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, in 3 ml Medium aufgenommen, 5 min bei 250 g zentrifugiert, abgesaugt, in 2 ml Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche mit 12 ml RPMI-Medium pipettiert.

3.2.19. Optimierung der Transfektion mit LipofectAMINE-PLUS™

Für die Transfektion von Säugerzellen, d.h. den Transfer fremder DNA und die Expression der eingeschleusten genetischen Information, stehen verschiedene Techniken zur Verfügung. Die Elektroporation erfordert einen hohen apparativen Aufwand und ist wie die Calciumphosphat-Copräzipitation und die Transfektion mittels Diethylaminoethyl-Dextran (DEAE-Dextran) relativ toxisch für die Zellen (KINGSTON, 1997). Die Transfektion mittels verschiedener Viren ist aus oben bereits genannten Gründen in diesem Fall nicht angebracht.

Die liposomenvermittelte Transfektion dagegen erfordert minimalen apparativen Aufwand und ist in relativ kurzer Zeit möglich.

Kationische Lipide

Kationische Lipide, die mit DNA komplexiert werden, stellen ein effizientes Mittel zur Genübertragung dar; ihre Verwendung ist weniger risikoreich als die Transfektion mit Virusmaterial.

Das kationische Lipidreagenz bildet in Wasser kleine unilamellare Liposomen. Die negativ geladene DNA bindet spontan an die positiv geladenen Liposomen (LEDLEY, 1995). Es wird angenommen, daß zwei bis vier Liposomen sich mit einem einzigen Plasmid verbinden (FELGNER et al., 1987). Dieser Komplex wird dann durch Endozytose in die Zelle aufgenommen (ZABNER, 1995).

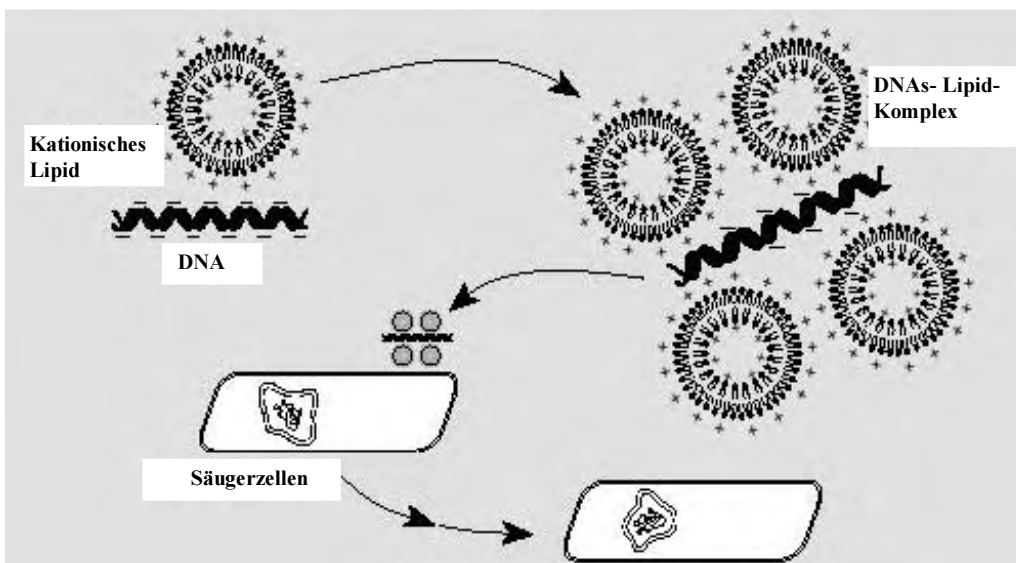


Abb.6: Schematische Darstellung der Transfektion mit kationischen Lipiden („Guide to eukaryotic Transfections with Cationic Lipid Reagents“, © 1999 Life Technologies)

Für diese Versuche wurde als Transfektionsreagenz LipofectAMINE-PLUS™ (invitrogen) verwandt.

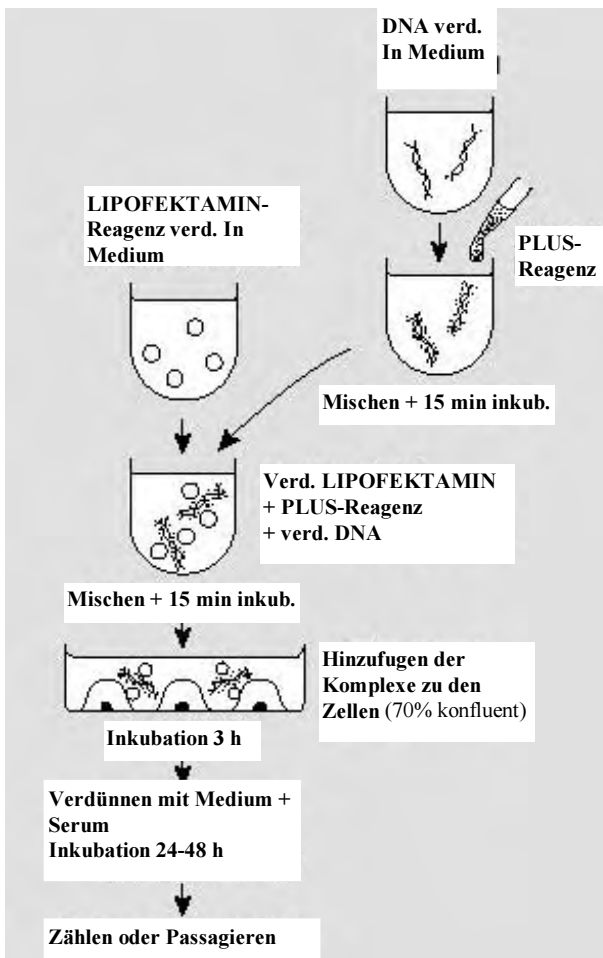


Abb. 7: schematische Darstellung der Transfektion mit LipofectAMINE-PLUSTM, „Guide to eukaryotic Transfections with Cationic Lipid Reagents“, © 1999 Life Technologies

Vorbereitung der Transfektion

Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen trypsiniert, damit am Tag der Transfektion 70 bis 90% der Zellen konfluent sind.

Auf die sterilen Glasplättchen, die in allen Vertiefungen einer 24-well-Zellkulturplatte vorgelegt waren, wurden 1×10^5 Zellen in 500 μ l RPMI (5% FKS, ohne Antibiotika) pipettiert.

Tag der Transfektion

1. Zuerst wurde das Plasmid (pGFP-cIL-4) mit Medium (ohne Serum +Antibiotika) und PLUS-Reagenz in Eppendorfgläsern verdünnt und für 15 min inkubiert.

Ansatz	RPMI (µl)	PLUS-Reagenz (µl)	DNA (µg)
A	168	7	0,7
B	161	14	1,4
C	147	28	2,8
D	119	56	5,6

Danach wurde jeweils 25 µl aus Eppendorfgefäß A in 6 Vertiefungen einer 96-well Rundbodenmikrotiterplatte (Greiner), Reihe a (1-6), pipettiert. Die Prozedur wurde für die Eppendorfgefäße B, C und D wiederholt.

2. Das LipofectAMINE-Reagenz wurde ebenfalls mit Medium (RPMI ohne Serum) vorverdünnt und 25 µl der Mischung in die einzelnen Reihen der Mikrotiterplatte pipettiert. Danach wurde durch Pipettieren gemischt und für 15 min inkubiert.
3. Bevor die LipofectAMINE-DNA-Komplexe auf die Zellen gegeben wurden, mußte das Medium noch durch 200 µl frisches RPMI ohne Serum/Vertiefung ersetzt werden.
4. 55 µl der Komplexe und 750 µl RPMI ohne Serum wurden in jede Vertiefung der 24-well-Platte gegeben, durch Pipettieren vorsichtig gemischt und für 3 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.
5. Danach wurde das Medium, das die Komplexe enthielt, durch frisches Medium mit 5% FKS ersetzt. Die Auswertung der Transfektion erfolgte dann 48 h nach der Transfektion im Fluoreszenzmikroskop.

3.2.20. Fluoreszenzmikroskopie mit Green Fluorescent Protein (GFP)

Die Klonierung des Gens für das Green Fluorescent Protein aus *Aequorea victoria* (PRASHER et al., 1992) ermöglicht die Expression von GFP in prokaryoten und eukaryoten Systemen. GFP wird in heterologen Systemen in Abwesenheit von exogenen Substraten synthetisiert und kann deshalb als Reporterprotein in vielen Organismen verwendet werden (CHALFIE et al., 1994; KAIN et al., 1995; PINES, 1995; CHENG et al., 1996).

GFP fluoresziert *in vivo* nach Energietransfer von Aequorin, einem Ca^{2+} -aktivierten Photoprotein (INOUE u. TSUJI, 1994). GFP absorbiert UV- und blaues Licht ($\lambda_{\text{max}} = 395$ und 470 nm) und emittiert grünes Licht ($\lambda_{\text{max}} = 509$ nm) (KAIN et al., 1995), das mit dem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden kann.

GFP eignet sich als Marker der Genexpression in Pflanzen- und Säugerzellen (CORMACK et al., 1996; PINES, 1995), sowie zur Proteinlokalisierung und Visualisierung des Proteintransportes in der Zelle (KAIN et al., 1995; KAETHER u. GERDES, 1995).

Um die Glasplättchen, auf denen die transfizierten Zellen konfluent gewachsen waren, unter dem Fluoreszenzmikroskop genau betrachten und konservieren zu können, wurden sie kurz mit Aquabidest. gespült, mit einem Tropfen $0,1$ M Tris, pH 8 , 50% Glycerin benetzt und mit der Oberseite nach unten auf einen Objektträger gegeben.

Beurteilt wurden 10 Gesichtsfelder/ Vertiefung.

3.2.21. Nachweismethoden rc-IL-4

3.2.21.1. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode zur Vervielfältigung von Desoxyribonukleinsäuren. Spezifische DNA-Sequenzen können dabei in einem Reaktionsgefäß in einem einzigen Reaktionszyklus mit hoher Ausbeute angereichert werden. Das Prinzip entspricht dem Vorgang der Verdopplung bei der Zellvermehrung. Um diesen Prozeß in Gang zu setzen, werden ein geeignetes Puffersystem, Desoxynukleotide, die zu kopierende DNA-Matrize, die DNA-Polymerase als Vervielfältigungsenzym und spezifische Oligonukleotid-Primer als Starter benötigt. In drei sich wiederholenden Teilschritten (Aufschmelzen der DNA bei $>90^{\circ}\text{C}$, Hybridisieren der Oligonukleotid-Primer mit den DNA-Matrizensträngen bei ca. 37 bis 72°C und Polymerisation der DNA-Matrizenstränge) werden die DNA-Stränge bei jedem Zyklus verdoppelt. So kommt es zur spezifischen Anreicherung der Zielsequenz trotz eines hohen Hintergrundes an anderen DNA-Molekülen (SCHWÄGELE, 1999).

3.2.21.1.1. RNA-Extraktion

Die Extraktion der gesamten RNA der Knorpelzellen erfolgte mit dem TriStar-Reagenz, angelehnt an die Herstellervorschrift.

Zu den transfizierten Knorpelzellen wurde in jede Vertiefung der 24-well-Platte nach Absaugung des Mediums 1 ml TriStar-Reagenz gegeben. Danach wurde mit 200 µl Chloroform geklärt, die RNA mit der klaren oberen Phase abpipettiert und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurde das Eppendorfgefäß für 10 min bei 12.000 g zentrifugiert.

Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, das RNA-Pellet mit 75% Ethanol gewaschen, erneut bei 12.000 g 5 min zentrifugiert und danach an der Luft getrocknet. Vor der weiteren Behandlung wurde mit 20 µl DEPC-behandeltem Aqua bidest aufgefüllt. Quantifiziert wurde die RNA in einem Spektrophotometer bei 260 nm.

3.2.21.1.2. Synthese der cDNA aus RNA

1-5 ng RNA wurden jeweils in 20 µl - Reaktionen mit 15 U AMV („avian reverse transcriptase“, Gibco-BRL), 2,5 mM Oligo-dT 15 Primer, 1 mM Desoxynucleosid Triphosphat (Boehringer Mannheim), 20-40 U Ribonucleaseinhibitor (Promega) und MgCl₂ übersetzt.

Bevor der RT-Mix dazugegeben wurde, wurde die RNA-Probe für 5-10 min bei 70°C inkubiert und für ein paar Minuten auf Eis gelagert. Nach Zugabe aller Komponenten der Reaktion wurde die Mischung für 50 min bei 42°C im Wasserbad inkubiert. Die Inaktivierung der Enzyme erfolgte anschließend bei 95 °C für 5 min. Danach wurden die entstandenen cDNAs fünffach mit 80 µl H₂O-DEPC verdünnt und bei -20°C gelagert.

3.2.21.1.3. Oligonukleotidprimer für IL-4

Die Sequenzzugangsnummer beim nationalen Center für biotechnologische Informationen (NCBI) für das canine Zytokin IL-4 lautet:

AF239917

IL-4 S CAC CAG CAC CTT TGT CCA CGG

IL-4 AS CAG CTT CAA TGC CTG TAG TAT TTC

Die Länge des Amplikons beträgt 353 bp.

3.2.21.1.4. PCR

2-5 µl der verdünnten cDNA wurden unter Verwendung von 1,25 U-Taq-Polymerase in 50µl Reaktionen amplifiziert. Die 50 µl bestehen aus 5 µl 10fachem PCR-Reaktionspuffer (500 mM KCl, 1 mM Tris-HCl, pH 9,0, 1% Triton-X-100), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,2 µM von jedem Primer (3' und 5'), 1,25 U-Taq-Polymerase und der jeweiligen Menge an cDNA. Die Amplifikation erfolgte in 35 PCR-Zyklen. Bevor die Proben die Zyklen durchliefen, wurden sie für 3 min auf 93°C aufgeheizt, um die DNA zu denaturieren. Anschließend begann der eigentliche PCR-Zyklus: 1 min bei 94°C, 1,5 min bei 50°C, 2 min bei 72°C und zum Abschluß nochmals 10 min bei 72°C.

3.2.21.1.5. Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in 2% Agarosegelen bei einer Spannung von 100 V mit TAE (40 mM Tris-HCl, pH 8,3, 40mM Eisessig, 1 mM EDTA) und 0,5µg/ml Ethidiumbromid als Lauf- und Gelpuffer.

Die DNA-Proben wurden im Verhältnis 1:5 mit Stopplösung (73 mM Saccharose, 100 mM Tris-HCl, pH 7,6, 63 mM EDTA, 1% Bromphenolblau) versetzt und 5 ml eines DNA-Markers (Smart-Ladder) als Konzentrations- und Größenstandard aufgetragen.

Die resultierenden fluoreszierenden Banden wurden mit der digitalen UV-Gel Kamera (Kapa CF 8/1 RCC9) dokumentiert.

3.2.21.2. ELISA

Um die Expression von IL-4 schnell und in einer großen Anzahl von Proben nachweisen zu können, ist der langwierige T-Zellblasten-Stimulations-Bioassay, der bisher als einziges Nachweissystem von caninem IL-4 zur Verfügung stand, nicht geeignet.

Deshalb wurde von uns ein direkter Sandwich-ELISA unter Benutzung der von uns hergestellten monoklonalen und polyklonalen Antikörper entwickelt.

Die Durchführung eines ELISA wurde erstmals durch ENGVALL u. PERLMAN zur quantitativen Bestimmung von Antigenen (1971), bzw. von Antikörpern (1972) beschrieben.

Dabei handelt es sich um einen Enzymimmunoassay (EIA), mit dessen Hilfe geringste Mengen an Antigen oder Antikörper nachgewiesen werden können.

Bei Enzymimmunoassays handelt es sich um immunologische Testverfahren, bei denen die Konzentration eines Analyten über die Aktivitätsbestimmung eines Markerenzym ermittelt wird.

Als Analyt fungiert bei diesem ELISA IL-4, das jedoch nicht direkt, sondern indirekt über spezifische Antikörper nachgewiesen wird. Der Nachweis solcher spezifischer Antikörper erfolgt im ELISA durch die Verwendung von enzymmarkierten Anti-Antikörpern und wird auch als Sandwich-ELISA bezeichnet. Das Antigen oder der spezifische Antikörper können dabei an die Festphase gebunden sein.

In den eigenen Untersuchungen wurde zum Nachweis spezifischer monoklonaler Antikörper z.B. ein indirekter nichtkompetitiver ELISA mit festphasengebundenem IL-4 (Antigen) verwendet.

Ein ELISA unterscheidet sich in der Art der Durchführung: kompetitiv, nicht kompetitiv; Antigen oder Antikörper an die Festphase gebunden; in der Verwendung polyklonaler Antiseren, gereinigt durch Absättigung oder Affinitätschromatographie bzw. nicht gereinigt und/oder Verwendung monoklonaler Antikörper; verschiedene Puffersysteme (TBS-, PBS-, Carbonat-Puffer) oder durchgeführt mit Hilfe von Verstärkersystemen wie z.B. in diesem Fall mit Biotin-Streptavidin.

Bei den ersten Versuchen zum Nachweis von caninem IL-4 wurde ein direkter ELISA durchgeführt. Die Platte wurde mit verschiedenen Konzentrationen von Protein A-gereinigten polyklonalen Antikörpern vom Kaninchen gegen rekombinantes IL-4 des Hundes über Nacht bei 4°C im Kühlschrank beschichtet. Bei der Sensibilisierung/Beschichtung der ELISA-Platten wurde in der Regel Natriumbicarbonatpuffer verwendet, getestet wurde auch PBS (JONES u. PATTERSON, 1985). Nach Blockierung mit 1% BSA in verschiedenen Waschpuffern (PBS/TBS) wurde die Platte dreimal gewaschen. Danach wurde das Antigen (IL-4) in einer Konzentration von 100 ng/Vertiefung aufgetragen und nach einer Inkubationszeit von 30 min bei RT erneut mit PBS gewaschen.

Jetzt wurde das IL-4 über die Bildung eines Immunkomplexes an die Festphase gebunden. Danach erfolgte die Zugabe der monoklonalen Antikörper meiner drei verschiedenen Hybridomzellkulturüberstände (1:10 verdünnt). Diese wiederum banden an die Immunkomplexe. Nach Zugabe eines enzymmarkierten Detektionsantikörpers (in verschiedenen Verdünnungen, 1:2000, 1:4000, 1:8000 und 1:16000), in diesem Fall Rb-Anti-Maus, peroxidase markiert, konnte mit einem hydrolysierbaren Substrat ($H_2O_2 + OPD$, Sigma), nach Stoppen der Enzymreaktion mit ELISA-Stopplösung H_2SO_4 , das farbige Reaktionsprodukt im ELISA-Reader bei 492 nm gegen

620 nm gemessen werden. Die gebundene Enzymmenge ist dabei ein direktes Maß für gebundenes Antigen.

Dieser ELISA wurde sowohl mit verschiedenen Konzentrationen an Beschichtungsantikörpern, mit verschiedenen Waschpuffern (PBS und TBS) und mit verschiedenen Konzentrationen an Detektionsantikörpern mehrmals wiederholt, um optimale Bedingungen für die höchste Sensitivität zu erreichen.

Da aber im Vergleich zu kommerziell erhältlichen IL-4-ELISA-Kits, z.B. aus der Humanmedizin, die Sensitivität des hier beschriebenen ELISAs deutlich niedriger war, mußte bei den nachfolgenden ELISAs ein Verstärkersystem (Biotin/Streptavidin) eingesetzt werden.

Der so optimierte ELISA für canines IL-4 stellt sich wie folgt dar:

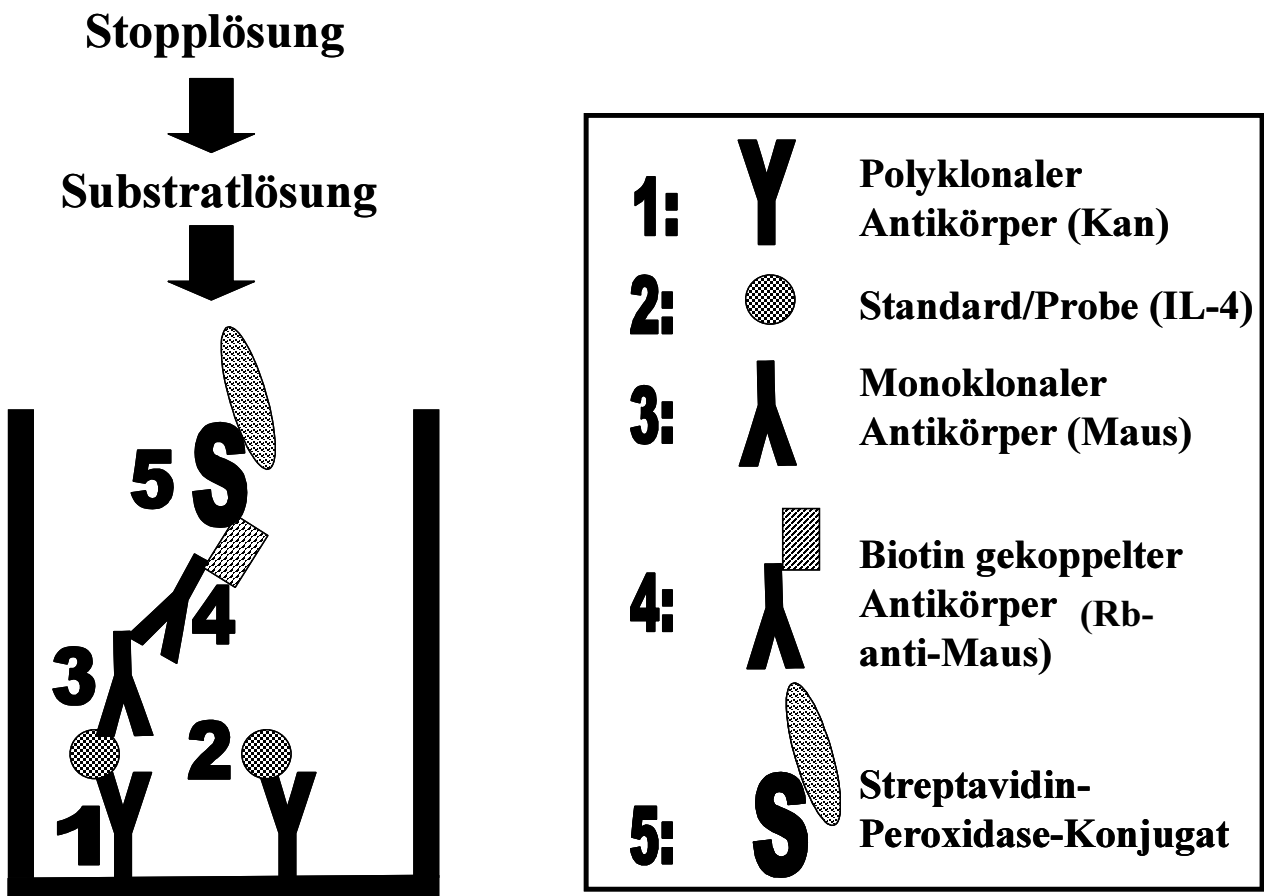


Abb.8: Schematische Darstellung des rIL-4-ELISA mit Verstärkersystem Biotin/Streptavidin

1. Beschichtung der ELISA-Platte

120 ng der ProteinA-gereinigten polyklonalen Antikörper vom Kaninchen wurden verdünnt in

Carbonatpuffer pro Vertiefung in die ELISA-Platte gegeben und 1 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert.

Danach wurde die ELISA-Platte entleert.

2. Blockierung

Nachdem die Antikörper an die Mikrotiterplatte gebunden hatten, mußten noch vorhandene freie Bindungsstellen abgesättigt werden, um dem Antigen die Möglichkeit zu nehmen, unspezifisch an die Platte zu binden. Dazu wurde ein Protein mit dem das Antigen nicht kreuzreagieren kann, hier BSA, benötigt.

50 µl/Vertiefung Blockierungspuffer (PBS+1% BSA) wurden hinzugegeben und 15 min bei RT inkubiert.

Danach wurde dreimal mit Waschpuffer (PBS) gewaschen.

3. Standard

Standard: rcIL-4 (1 mg/ml)

Verdünnungsreihe: $\sqrt{10}$ -1-Reihe

100 ng/Vertiefung

30 ng/Vertiefung

10 ng/Vertiefung

1 ng/Vertiefung

0,3 ng/Vertiefung

0,1 ng/Vertiefung

0,03 ng/Vertiefung

0,01 ng/Vertiefung

50 µl des Standards wurden in jede Vertiefung pipettiert, resp. 50µl Probenmaterial (ZKÜ) unverdünnt (s. Nachweis von rcIL-4 im Zellkulturüberstand transfizierter Zellen, 4.5.2.2.2.).

Inkubiert wurde für weitere 30 min bei RT.

Danach wurde die Platte dreimal gewaschen.

4. Erster Antikörper

Der monoklonale Antikörper aus dem Hybridomzellklon mP41 [37 µg/ml] wurde 1:10 verdünnt und in 50 µl Portionen in jede Vertiefung gegeben. Inkubation für 30 min bei RT. Anschließend wurde dreimal mit Waschpuffer gewaschen.

5. Zweiter Antikörper

Der biotinkoppelte Antikörper Rb-Anti-Maus (Sigma) wurde 1:5000 mit Waschpuffer verdünnt und in 50 µl-Portionen 30 min bei RT auf die Platte gegeben. Danach erfolgte erneutes dreimaliges Waschen.

6. Dritter Antikörper

Streptavidin-HRP (peroxidase markiert, Pharmingen) wurde 1:4000 mit Waschpuffer verdünnt, zu dem Versuch hinzugegeben und erneut 30 min bei RT inkubiert. Danach folgte zweimaliges Waschen mit Waschpuffer und einmaliges mit Aqua bidest, um Blasenbildung zu vermeiden.

7. Substratreaktion

Es wurden 50 µl/Vertiefung OPD-Substratlösung (Orthophenylendiamin) pipetiert; die Inkubation erfolgte 30 min.

8. Stopreaktion

Auch sehr geringe Mengen an Enzym würden über einen gewissen Zeitraum den ganzen vorhandenen Farbstoff spalten. Alle Proben hätten dann die gleiche optische Dichte und eine Quantifizierung wäre nicht mehr möglich. Darum muß die Reaktion nach einer gewissen Zeit, wenn gute Kontraste sichtbar sind, abgebrochen werden. Dazu zerstört man das Enzym und stoppt somit die Farbreaktion.

Gestoppt wurde die Substratreaktion mit 50 µl 1 M H₂SO₄-Lösung pro Vertiefung (Farbumschlag zu gelb) nach einer vorher festgelegten Zeit (30 min), so daß vergleichbare Ergebnisse gewonnen werden konnten.

9. Messung

Die Messung der Farbintensität erfolgte im ELISA-Reader bei 492 nm.

Die Menge gebundener Proteine wurde durch einen biotinylierten Antikörper und Streptavidin-Peroxidase-Konjugat bestimmt.

10. Auswertung der Meßergebnisse

Die einfachste Methode der Quantifizierung, die Berechnung der Konzentration anhand eines Standards, verwendet man, wenn eine Reinstprobe (Standard), in diesem Fall das rcIL-4 [1 mg/ml], mit genauer Konzentrationsangabe zur Verfügung steht.

Aus der Standardkurve wurde dementsprechend mittels Sigma-Plot die Eichgerade für rcIL-4 errechnet, anhand derer das Programm in der Lage ist, die genauen Konzentrationen der einzelnen Proben zu ermitteln.

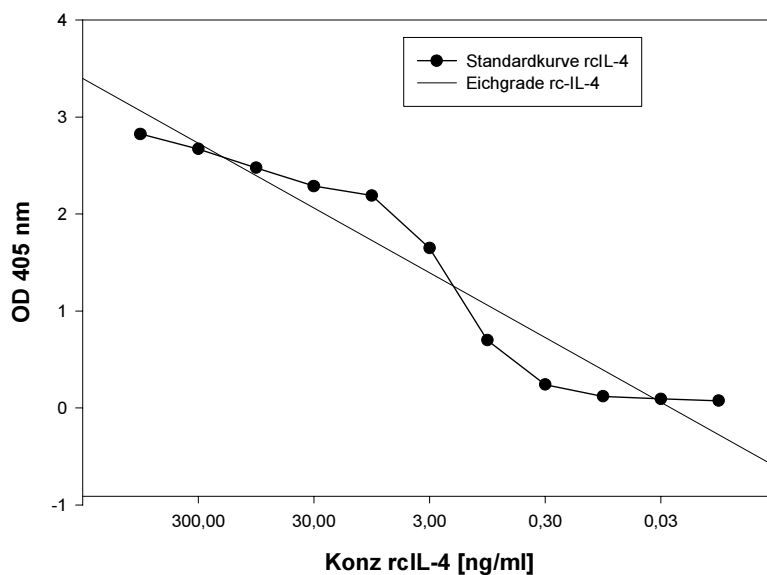


Abb.9: Eichgerade mit Standardkurve rcIL-4, erstellt durch Sigma-Plot 5.0