

4 Ergebnisse

4.1. Gewinnung des rekombinanten IL-4

Für die Expression des His-markierten rcIL-4 in *E.coli* konnten die Ergebnisse genutzt werden, die in Zusammenarbeit mit Dr. Wondimu als Vorarbeit für diese Arbeit erzielt wurden.

4.2. Gewinnung polyklonaler Antikörper gegen IL-4

Antikörper gegen canines IL-4 waren kommerziell oder von anderen Arbeitsgruppen nicht erhältlich. Antikörper gegen humanes IL-4, bzw. gegen IL-4 aus besser untersuchten Tierspezies zeigen keine Kreuzreaktivität mit caninem IL-4. Das gereinigte und rekombinante IL-4 wurde an die Firma "Seqlab" in Göttingen geschickt, wo polyklonale Antikörper im Kaninchen gewonnen wurden.

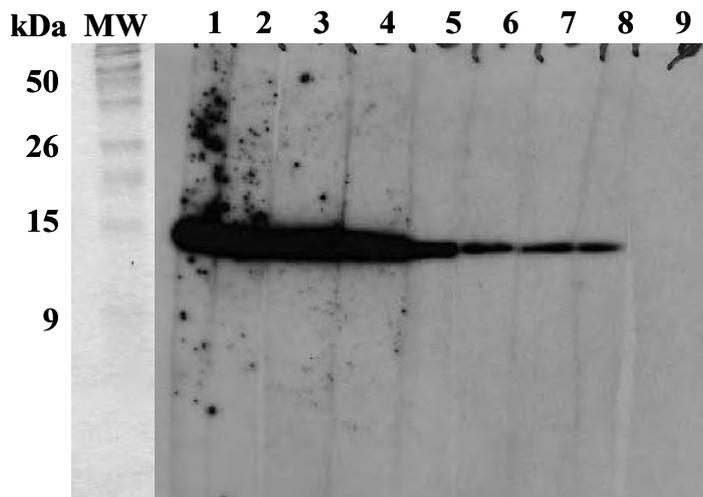


Abb.10: Westernblot von Rbanti-rcIL-4. Rekombinantes IL-4 (1,88 mg) wurde auf ein 15% SDS-Gel aufgetragen und geblottet. Die Membran wurde in einzelne Streifen geschnitten und mit unterschiedlicher Antikörperkonzentration inkubiert. Reihe 1: Rbanti-rcIL-4 14 η g/ml, Reihe 2: 7,3 η g/ml, Reihe 3: 4,9 η g/ml, Reihe 4: 3,6 η g/ml, Reihe 5: 1,4 η g/ml, Reihe 6: 0,7 η g/ml, Reihe 7: 0,5 η g/ml, Reihe 8: 0,3 η g/ml, Reihe 9: neg. Kontrolle

4.2.1. Aufreinigung der polyklonalen Antikörper

Danach wurden die Antikörper mittels einer Protein A-Säule nach gängiger Methode, siehe oben, gereinigt.

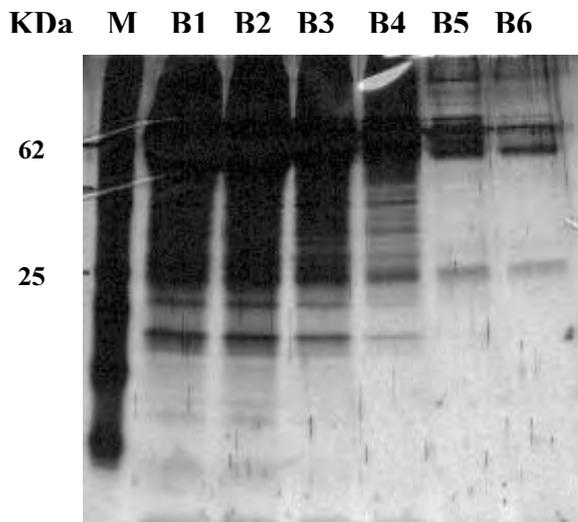


Abb.11: Silberfärbung: Waschungsschritte mit Bindungspuffer. Um die Protein A-Säulen zu reinigen, wurden sie vor Gebrauch mit Elutionspuffer (0,1 M Glycin-HCl, pH 2,8, 0,15 M NaCl) und danach mit Bindungspuffer (0,1 M Tris-HCl, pH 7,5, 0,15 M NaCl) gewaschen. 2 ml dialysiertes Kaninchenserum wurde auf die Säule gegeben und mit dem zehnfachen Volumen Bindungspuffer gewaschen (B1-B6).

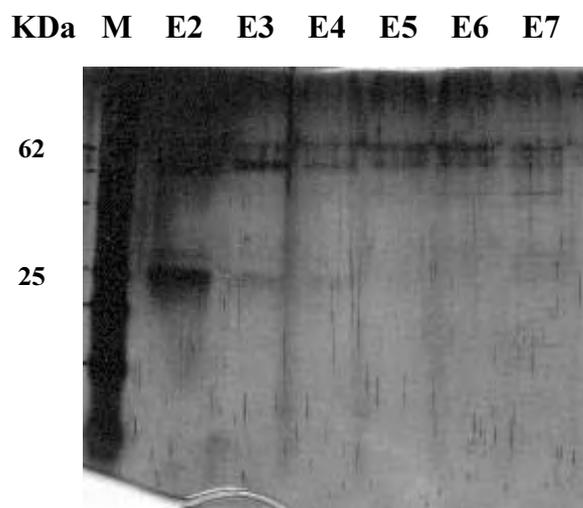


Abb.12: Silberfärbung: Eluatfraktionen der Protein A-Reinigung, gewonnen mit Elutionspuffer (0,1 M Glycin-HCl, pH 2,8, 0,15 M NaCl). Die Elution der Antikörper erfolgte in 2 ml-Fraktionen (E2-E7).

Die Antikörper enthaltenden Fraktionen E2 und E3 wurden erneut bei 4°C über Nacht gegen PBS dialysiert (E2 7,3 mg/ml und E3 2,7 mg/ml, gemessen nach Bradford).

4.3. Herstellung der monoklonalen Antikörper gegen canines IL-4

Seit Beginn der 70er Jahre finden monoklonale Antikörper zunehmend Verwendung im Bereich der klinischen Diagnostik, beispielsweise zum qualitativen und quantitativen Antigennachweis. 1975 gelang es KÖHLER und MILSTEIN erstmals, Maus-Myelomzellen mit B-Lymphozyten aus der Milz von Mäusen zu verschmelzen (somatische Hybridisierung). Die so entstandenen Hybridomzellen konnten die gewünschten Eigenschaften der „Elterngeneration“, unbegrenzte Teilungsfähigkeit und Produktion von monoklonalen Antikörpern einer einzigen Spezifität, auf sich vereinigen.

Monoklonale Antikörper für meine Arbeit wurden in Kooperation mit dem Paul-Ehrlich-Institut (PEI, Langen) hergestellt. Bei meinem Aufenthalt am PEI habe ich einige Arbeitsschritte und Techniken im Zusammenhang mit der Hybridomzellherstellung und Gewinnung monoklonaler Antikörper erlernen können:

- 1.) Fusion der Milzzellen mit den Myelomzellen,
- 2.) Optimierung/Screening der Fusionsansätze,
- 3.) Isotyping der monoklonalen Antikörper,
- 4.) FKS-freie Kultivierung von Hybridomzellen.

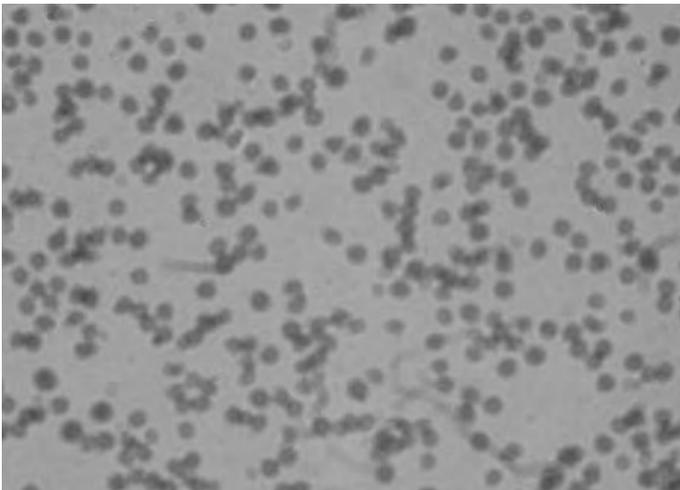


Abb.13: Hybridomzellen mP41, 100x vergrößert

4.3.1. Kontrolle der Fusionsansätze auf Antikörpergehalt

Von den zahlreichen Fusionen, die angesetzt worden waren, wurden drei ausgewählt, da sie, lichtmikroskopisch beurteilt, die höchste Teilungsrate aufwiesen:

mP41: Diese Hybridomzellen wuchsen schnell.

mP42: Diese Hybridomzellen wuchsen langsamer, benötigten eine „Feeder“Zell-Platte (Aufzuchtmedium mit Peritonealmakrophagen).

mP43: Dieser Zellklon wuchs im Vergleich mit den beiden anderen am langsamsten und wurde auch auf eine „Feeder“Zell-Platte verbracht.

Der ELISA zum Nachweis von Maus-IgG dient primär zur Unterscheidung zwischen antikörperproduzierenden und nicht-produzierenden Klonen. Der ELISA ist nach dem Sandwich-Prinzip aufgebaut.

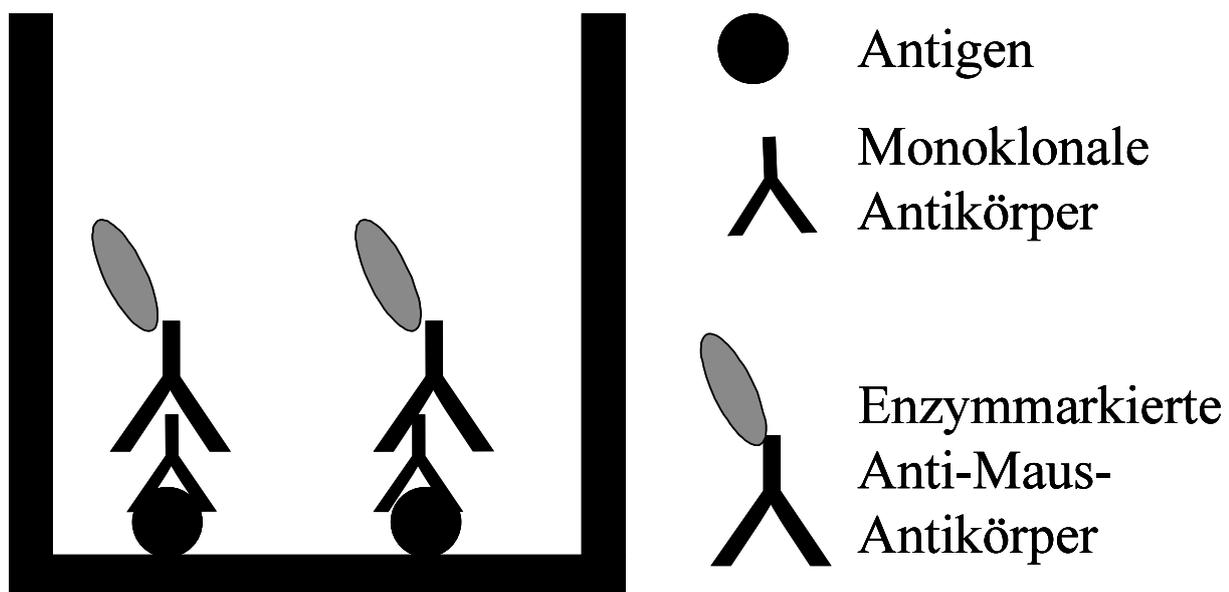


Abb.14: Schematische Darstellung des Sandwich-ELISA zum Nachweis von Maus-IgG. Beschichtet wurde mit dem Antigen rcIL-4 [1 mg/ml]. Der Nachweis erfolgte mit einem enzymgekoppelten AK (Rb-anti-Maus-Ig-POD). Die Bindung des Konjugates wurde über eine Farbreaktion Orthophenyldiamin (OPD)-Substrat nachgewiesen.

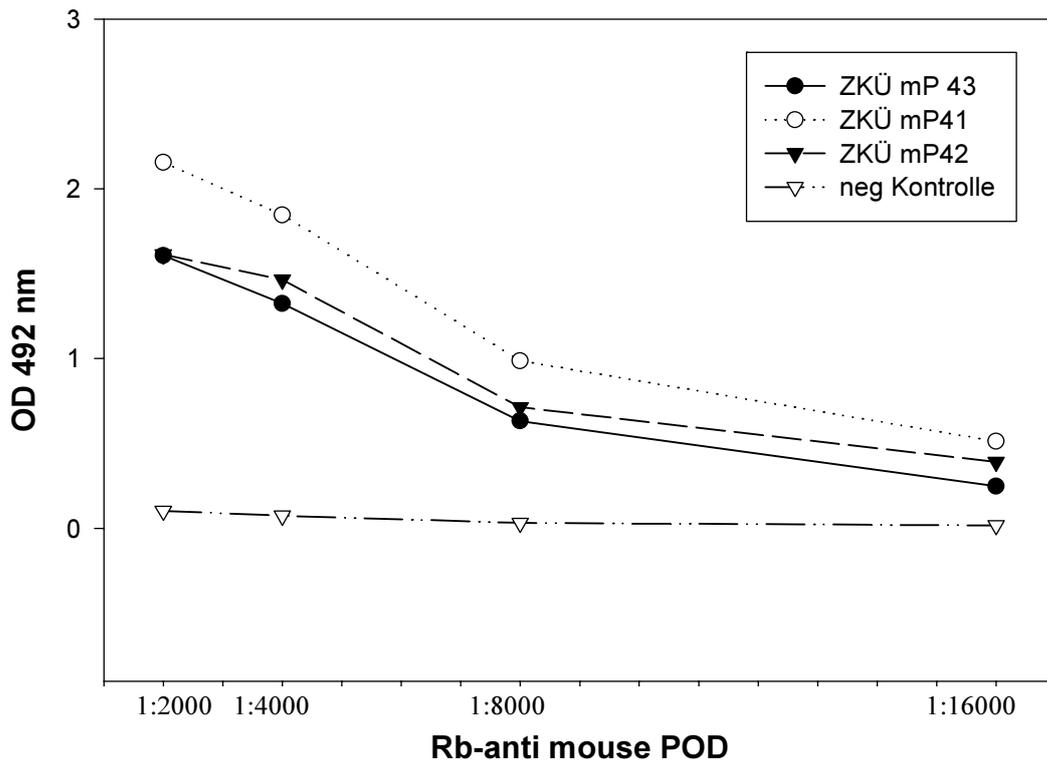


Abb.15: Beschichtung der ELISA-Platte: Rekombinantes (rc)IL-4[200 ng/well], 1. Ak: ZKÜ 41, 42, 43, Detektionsantikörper: Rb-anti-Maus-POD (Verdünnung s. x-Achse), Substrat: OPD (Orthophenyldiamin)

Anhand dieses ELISA konnte man nicht nur ablesen, daß alle drei hier untersuchten Zellklone (mP41, mP42 und mP43) Antikörper produzierten, sondern es fiel auf, daß Zellklon mP41 die höchste OD erreichte. Der Negativkontrolle diente der Waschpuffer (PBS).

4.3.2. Gesamt-IgG-Bestimmung der Zellkulturüberstände und anschließende Isotypenbestimmung

Um zu bestimmen, wie hoch die Konzentration an monoklonalen Antikörpern in den einzelnen Zellklonen war, wurde eine Gesamt-IgG-Bestimmung vorgenommen.

Die Konzentration an Gesamt-IgG der Zellkulturüberstände betrug:

mP41: 37 µg/ml

mP42: 30,9 µg/ml

mP43: 15,5 µg/ml

Durch die Isotypisierung von Antikörpern kann man sie verschiedenen Klassen zuordnen und den Subtypen feststellen. Um welchen Subtypen es sich jeweils handelt, macht eine Aussage über Stabilität und Affinität des Antikörpers möglich. Protein A, z.B. aus der Zellwand von *Staphylococcus aureus* gewonnen, bindet mit einer unterschiedlichen Affinität an die Fc-Teile der verschiedenen IgG-Subtypen. Dies kann man sich dann in der Aufreinigung zu Nutze machen. Bei monoklonalen Antikörpern handelt es sich bei allen Klonen um die Klasse IgG. Wie man der Abbildung 16 entnehmen kann, produzierte der Hybridomzellklon mP41 vermehrt Antikörper der Klasse IgG2b, und im ZKÜ des Zellklons mP42 und mP43 befanden sich vermehrt Antikörper des Subtyps IgG1. Für die schweren Ketten des Zellklons mP41 konnten IgG1 und IgG2a Subtypen nachgewiesen werden. Dies widerspricht nicht der Monoklonalität des Hybridomzellklons. Bedingt durch die Art der Immunisierungen, kommt es während der Immunantwort zu einem sog. Immunglobulin-Klassen-switch von IgM zu IgG. Somit ist die IgG-Klasse und vor allem die IgG1-Subklasse mit bis zu 85% im Blutserum vertreten, und ein Teil der Hybridomzellen bildet anschließend Antikörper einer anderen Subklasse. Durch die Deletion in λ -Gencluster von Mäusen kommt es zu einer 95% Expression der κ -leichten Kette (FISCHER 1990; LEWIN 1996).

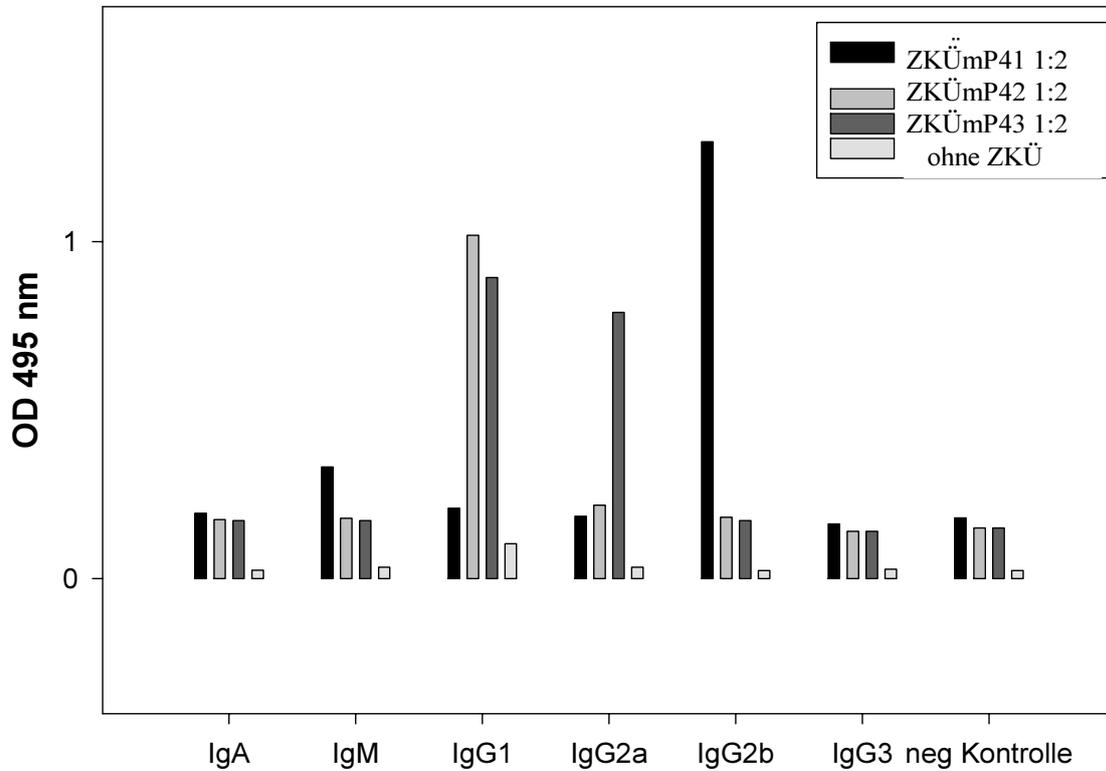


Abb.16: Isotypisierung der drei verschiedenen monoklonalen Antikörper mP41, mP42 und mP43, mittels ELISA. Beschichtung: rcIL-4 [125 ng/Vertiefung], 1.Ak.: Zellkulturüberstände mP41, mP42 und mP43, 2.Ak.: verschiedene Ziegen-Isoantikörper (s. x-Achse) 1:1000 verdünnt, Detektionsantikörper: Rb-anti-Ziege-POD 1:5000 verdünnt, Substrat: OPD (Orthophenyldiamin)

Aufgrund der höchsten Konzentration an monoklonalen Antikörpern im Zellkulturüberstand und der guten Wachstumseigenschaften wurde schließlich Hybridomzellklon mP41 für die weiterführenden Untersuchungen ausgewählt.

4.4. Entwicklung des direkten Sandwich-ELISA

4.4.1. Optimierung des Testsystems zum Nachweis der Expression von IL-4

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 zur Verfügung stand, nicht geeignet. Der Bioassay beruht auf folgendem Testprinzip: Mononukleäre Leukozyten werden mit Con A stimuliert, so daß eine Vielzahl von Lymphoblasten entstehen. Diese werden in gleicher Anzahl (1×10^6) in eine Mikrotiterplatte verbracht. Danach werden verschiedene Verdünnungen an rekombinantem caninen IL-4 hinzugegeben und mit radioaktiv markiertem Thymidin ($0,5 \mu\text{Ci/ml}$) inkubiert. Anhand der radioaktiven Inkorporation kann man dann Rückschlüsse auf die Bioaktivität des rekombinanten IL-4 ziehen (BUCHAN et al., 1991). Dieses Nachweissystem ist sehr aufwendig, da mit radioaktivem Material gearbeitet werden muß und ein Beta-Counter zur Messung der Radioaktivität zur Verfügung stehen muß. Außerdem ist es ein enormer zeitlicher Aufwand. Der komplette Test dauert fünf Tage. Für einen Routineeinsatz ist er also ungeeignet. Deshalb wurde ein direkter Sandwich-ELISA unter Benutzung der von uns hergestellten monoklonalen und polyklonalen Antikörper entwickelt.

Beim Sandwich-ELISA steht dem Vorteil, ohne radioaktive Isotopen auszukommen, der Nachteil entgegen, daß zwei zytokinspezifische Antikörper zur Verfügung stehen müssen: ein "*Capture Antibody*" und ein "*Detecting Antibody*". Diese beiden Antikörper sollten nicht die gleichen Epitope des Antigens erkennen. Ob sich ein monoklonaler Antikörper als "*Capture Antibody*" oder "*Detecting Antibody*" eignet, kann nicht vorausgesagt werden, sondern ist nach dem Prinzip von Versuch und Irrtum auszuprobieren. ProteinA-gereinigte polyklonale Antikörper wurden in diesem Fall als "*Capture Antibodies*" eingesetzt und monoklonale als "*Detecting Antibodies*".

4.4.1.1. Einfluß der Konzentration des Beschichtungsantikörpers (*Capture Antibody*) auf die Meßergebnisse

Voraussetzung für die Beschichtung von Plastikmaterialien mit Antikörpern ist die Isolierung der Immunglobulin-G-Fraktion (IgG) aus dem Antiserum. Hierdurch wird sichergestellt, daß nur Immunglobuline adsorbieren und nicht unspezifische Proteine aus dem Serum, die natürlich in viel höherer Konzentration vorliegen (z.B. das Serumalbumin).

Die Beschichtung der Mikrotiterplatten beruht auf einer unspezifischen hydrophoben Wechselwirkung zwischen dem Trägermaterial und dem Proteinmolekül. Diese Interaktion stellt eine Proteinadsorption durch nicht-kovalente Bindung dar. Das für jedes Protein individuelle Bindungsverhalten hängt von dessen isoelektrischem Punkt, seiner Hydrophobizität und seinem Molekulargewicht ab.

Die direkte Plattenbeschichtung erfolgt durch die unmittelbare Bindung der jeweiligen Moleküle an das Trägermaterial.

Für die Beschichtung mit Antikörpern werden hauptsächlich die Immunglobuline der Klasse G verwendet (IgG). Damit die Antikörper in ausreichender Menge gebunden und nicht aufgrund der unspezifischen Proteinbindung durch andere Proteine verdrängt werden, müssen die Bindungsproteine in gereinigter Form, d.h. frei von anderen Proteinen, vorliegen. Das bedeutet, daß die Antikörper vor der Beschichtung durch geeignete Verfahren (z.B. Salzfällung, Affinitätsreinigung, Ionenaustauscher, Gelfiltration, Chromatographie, Elektrophorese u.s.w.), in meinem Fall durch Protein A-Fällung, aus dem Antiserum isoliert werden müssen.

Die Beschichtung ist in zwei Schritte unterteilt:

1. die eigentliche Beschichtung (Coating) der Vertiefungen mit Antikörpern in geeigneter Konzentration,
2. die Nachbeschichtung (Blocking) mit einer definierten Proteinlösung oder einem verdünnten Serum, in diesem Fall BSA.

Zur Ermittlung der geeigneten Menge an Beschichtungsantikörpern (Rb-anti-rcIL-4) wurden verschiedene Konzentrationen an Beschichtungsantikörpern (250 ng/well, 120 ng/well und 60 ng/well) so mit den verschiedenen Antigenmengen (rcIL-4: 100-0,001 ng/ml) kombiniert, daß man die einzelnen Paarungen miteinander vergleichen konnte. Die Ergebnisse sind in Abb. 17 gezeigt.

Die größte Extinktionsdifferenz betrug 0,762 und ergab sich bei der höchsteingesetzten Konzentration von rcIL-4 (100 ng/ml) und der Beschichtungsantikörperkonzentration von 120 ng/well.

Die Extinktion der Negativkontrolle (ohne Beschichtungsantikörper) lag unter den genannten Bedingungen bei 0,022. Der Plattenbackground (gemessene Extinktion bei der Leerwertkontrolle) betrug 0,015.

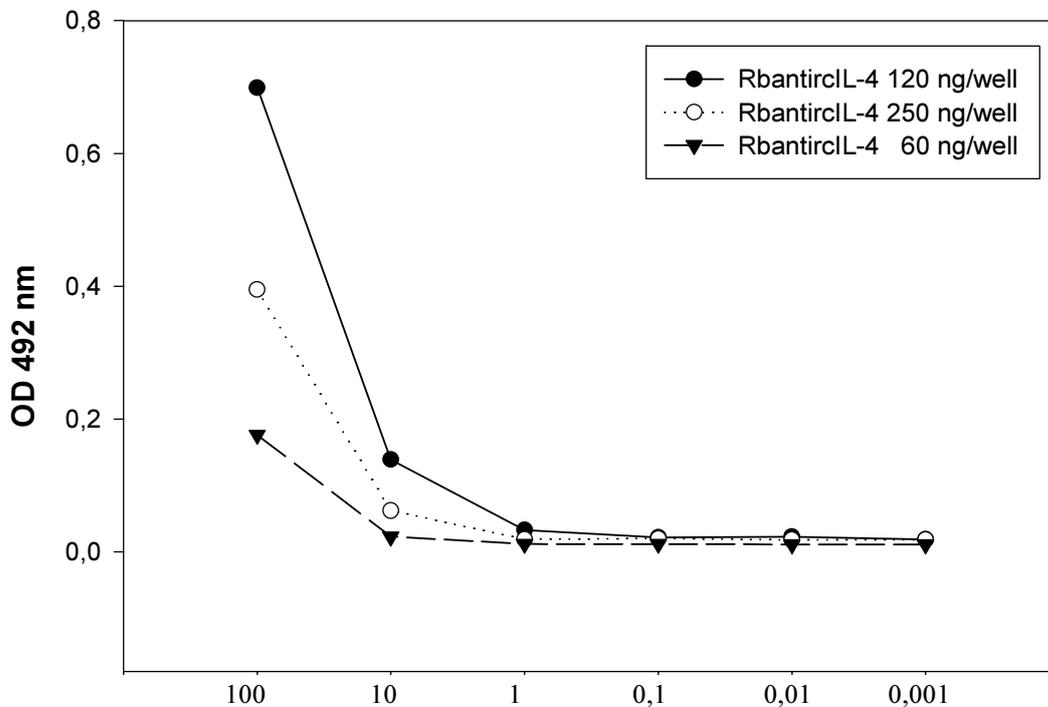


Abb. 17: Beschichtungen der ELISA-Platte, polyklonaler Ak Rb-anti-rcIL-4 (s. Legende); Antigen: rcIL-4 [100-0.001 ng/ml]; 1. Ak: ZKÜ mP41, monoklonaler Ak; Detektionsantikörper: Rb-anti-mouse-POD; Substrat: OPD (Orthophenyldiamin)

Die Nachbeschichtung dient zur Absättigung von unbeschichteten Flächen in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte, um spätere unerwünschte Adsorptionen aus der Testsubstanz zu vermeiden. Bei der Beschichtung spielen "individuelle" Eigenschaften der verschiedenen Antikörper und Antigene eine wesentliche Rolle. Um eine optimale Beschichtung der Immunreaktanten zu erreichen, muß daher die geeignete Kombination aus dem verwendeten Plattenmaterial, den Inkubationsbedingungen, der eingesetzten Proteinkonzentration und des Beschichtungspuffers (pH-Wert, Ionenstärke) gefunden werden.

4.4.1.2. Erprobung unterschiedlicher Beschichtungspuffer

Erfahrungen der Arbeitsgruppe des Paul-Ehrlich-Institutes in Langen haben gezeigt, daß sich die Sensitivität eines ELISA durch Verwendung unterschiedlicher Beschichtungspuffer ändern kann.

Im vorliegenden Fall wurden hierdurch keine wesentlichen Unterschiede in der Sensitivität erreicht. Wir haben uns für den Carbonatpuffer entschieden, da es sich hierbei um den gebräuchlichsten Beschichtungspuffer handelt. Dies wird aus den Ergebnissen in Abb.18 deutlich.

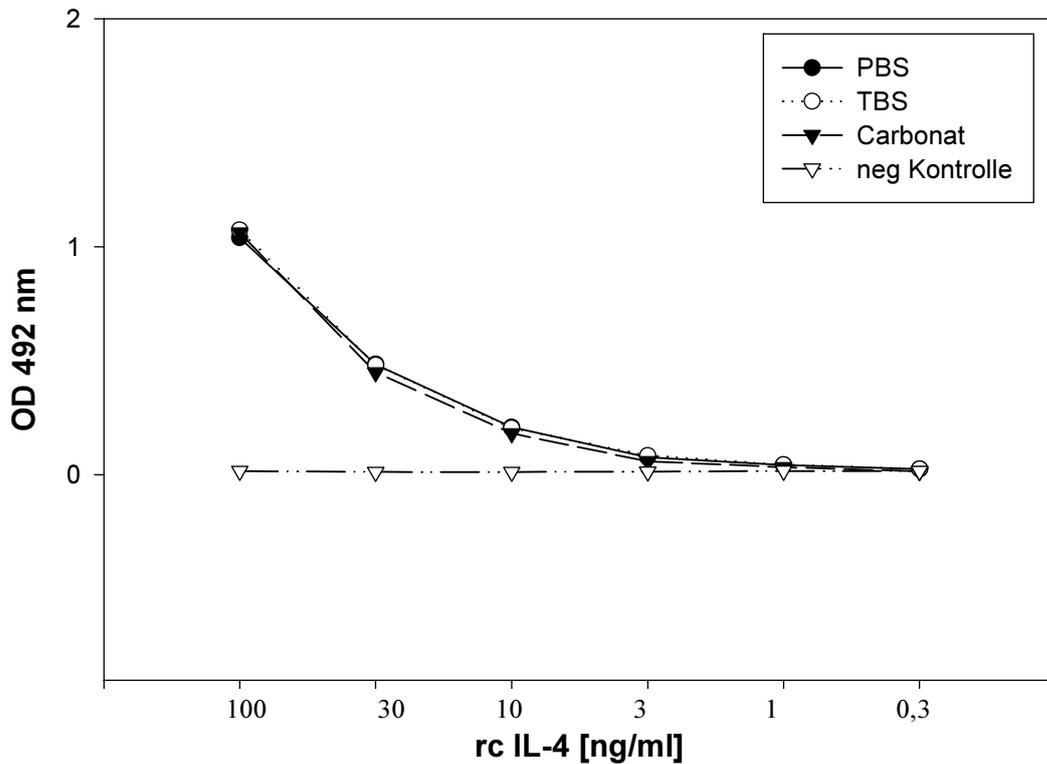


Abb. 18: Einfluß der Pufferauswahl bei der Beschichtung der ELISA-Platte: Rb-anti-rcIL-4 [120 ng/well]; polyklonaler Ak in unterschiedlichen Beschichtungspuffern (s. Legende); Antigen: rcIL-4 [100-0,3 ng/ml]; 1. Ak: ZKÜ mP41; monoklonaler Antikörper; Detektionsantikörper: Rb-anti-mouse-POD; Substrat: OPD (Orthophenyldiamin)

4.4.1.3. ELISA mit Verstärkersystem Biotin/ Streptavidin

4.4.1.3.1. Sensitivitätssteigerung des ELISA

Da bei kommerziell erhältlichen humanen IL-4-Testkits im Vergleich eine sehr niedrige Nachweisgrenze vorliegt (z.B. bis 2 pg/ml: [®]Human IL-Ready-Set-Co, eBioscience, [®]human IL-4 ELISA (BMS 225/2), BenderMedSystems GmbH, (BROWN et al., 1988; DEFRANCE et al., 1987)), haben wir versucht, ein Verstärkersystem einzusetzen, um die Sensitivität von ursprünglich 0,228 ng/ml = 10 pg Gesamtprotein zu erhöhen: **das Biotin-Streptavidin-System.**

Das Vitamin Biotin bindet stochiometrisch und mit hoher Affinität an ein Protein des Hühnereis, genannt Avidin, oder an ein entsprechendes Protein aus Streptokokken (*Streptomyces avidinii*), genannt Streptavidin. Diese spezifische, hochaffine Bindung macht man sich in der Immunologie in mehrstufigen Nachweisreaktionen zunutze (HARLOW u. LANE, 1999). Biotin läßt sich sehr einfach an Antikörper koppeln. Biotinylierte Antikörper reagieren mit Avidin oder Streptavidin, welche mit einem radioaktiven Isotop, einem fluoreszierenden Farbstoff, oder - wie in diesem Fall - mit einem Enzym (Peroxidase oder alk. Phosphatase) als Marker versehen ist oder an einen zweiten Antikörper gekoppelt ist.

Die Biotinylierung ist eine universell anwendbare Methode, die sich leicht auf alle Antikörper anwenden lässt. Hat man eine Palette verschiedener Primärantikörper, braucht man nur ein einziges Sekundärreagens, um alle primären Antikörper nachzuweisen. Dank der Biotinylierung lassen sich auch polyklonale Antikörper in einem Sandwich-ELISA einsetzen, da das mit Biotin reagierende Konjugat nicht mit dem nichtbiotinylierten Antikörper (Capture-Antikörper) reagiert. Außerdem muß man mit Kreuzreaktionen zwischen den Spezies rechnen, wenn man anstelle von biotinylierten Antikörpern enzymmarkiertes Antiglobulin (Anti-Antikörper) verwendet, so daß dieser Antikörper sowohl mit dem "Capture Antibody" als auch mit dem "Detecting Antibody" reagiert. Diesem Problem kann man mit Adsorption (Abfangen möglicherweise kreuzreagierender Antikörper) begegnen, was relativ aufwendig ist. Diesem Nachteil steht der Vorteil einer höheren Sensitivität gegenüber. Pro Molekül Biotin kann nur ein Molekül Streptavidin reagieren, im Falle von Antiglobulin reagieren mehrere Zweitantikörper mit einem Erstantikörper. Somit ist letztere Methode empfindlicher.

4.4.1.3.1.1. Ermittlung der optimalen Konzentration des mit Biotin gekoppelten zweiten Antikörpers

Zur Ermittlung der optimalen Konzentration wurde der mit Biotin gekoppelte zweite Antikörper (Sigma) in verschiedenen Verdünnungen (1:2000, 1:5000 und 1:10000) auf die einzelnen Konzentrationen an rcIL-4 (100-0,001 ng/ml) gegeben. Die Platte wurde einheitlich mit 120 ng/well Beschichtungsantikörper Rb-anti-rcIL-4 beladen.

Betrachtet wurden die Extinktionsunterschiede der einzelnen rcIL-4-Verdünnungen zu der Negativkontrolle (Antigenkontrolle).

Bei einer Biotin gekoppelten Antikörperverdünnung von 1:2000 und einer rcIL-4-Konzentration von 100 ng/ml erreichte die Differenz ihren maximalen Wert und lag bei 1,036. Bei einer Antikörperverdünnung von 1:5000 und rcIL-4-Konzentration von ebenfalls 100 ng/ml war die Differenz allerdings auch noch ausreichend und betrug 0,970. Daher wurde eine biotinkgekoppelte Antikörperverdünnung von 1:5000 für alle folgenden Untersuchungen als geeignet angesehen.

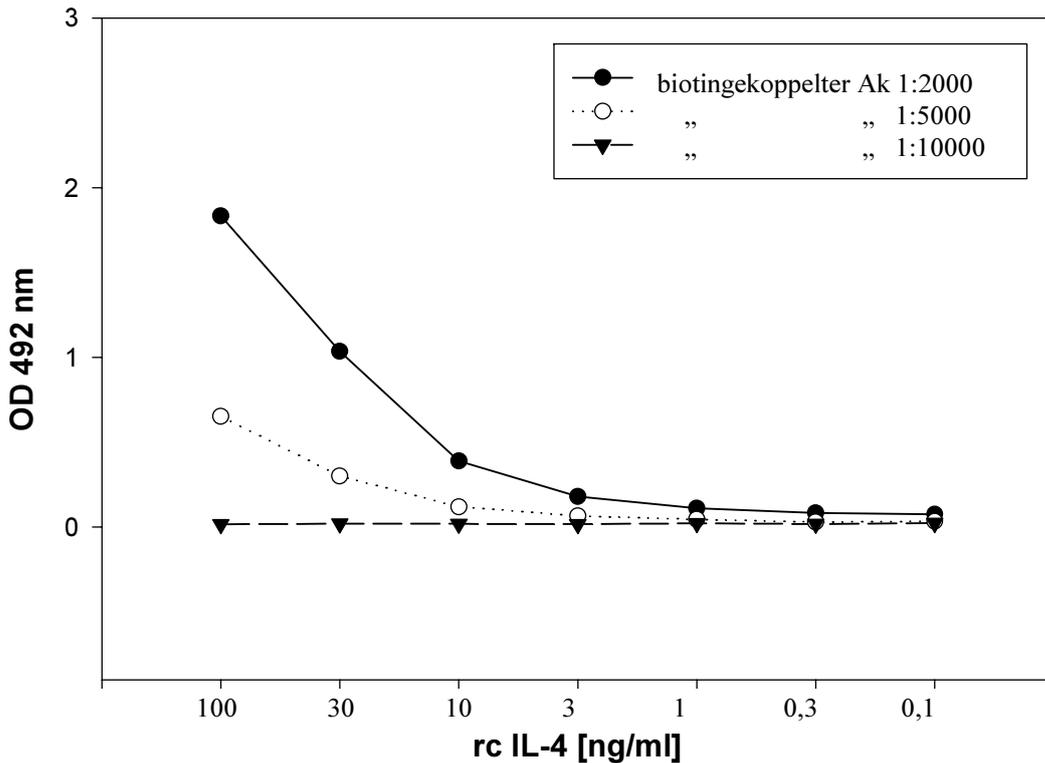


Abb.19: Beschichtung der ELISA-Platte: Rb-anti-rcIL-4 [120 ng/well], Antigen rcIL-4 [100-0,1 ng/ml], 1. Ak: ZKÜ mP41, 2. Ak: biotinkgekoppelter Ak, s. Legende, Konjugat: Streptavidin-POD (1:4000), Substrat: OPD (Orthophenyldiamin)

4.4.1.3.1.2. Optimale Konjugatverdünnung

Das Streptavidin-POD-Konjugat (BD Pharmingen) wurde laut Herstellerempfehlung in einer Verdünnung von 1:4000 verwendet.

4.4.1.3.2. Berechnung der Sensitivität des ELISA

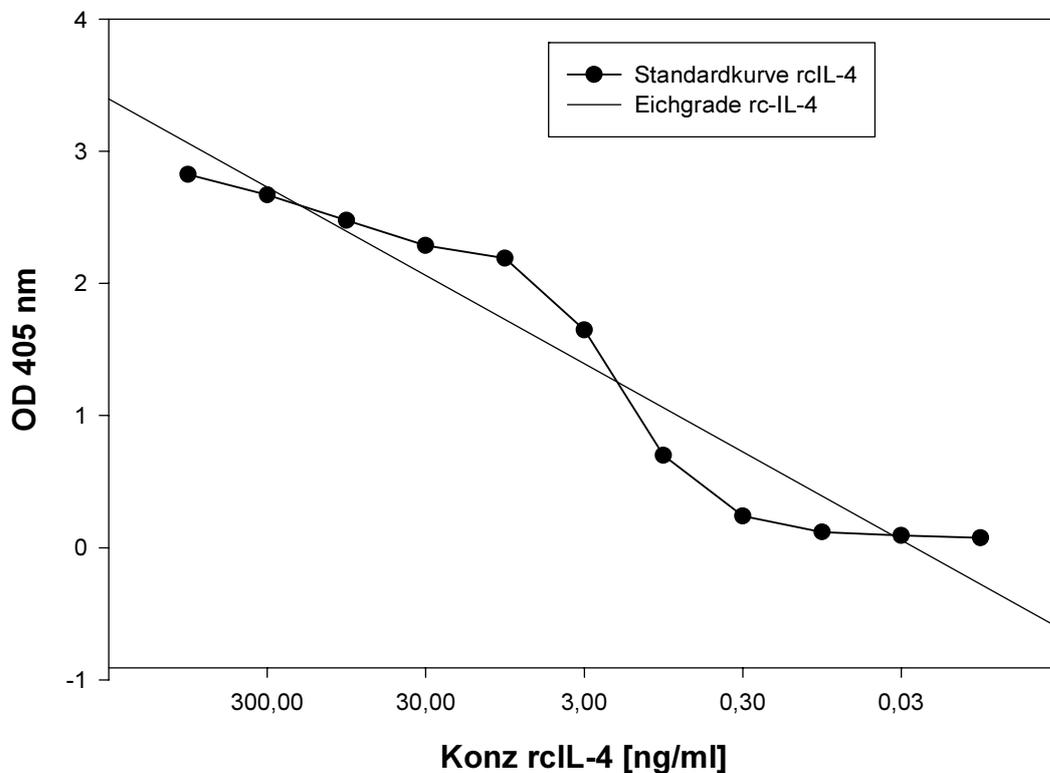


Abb.20: Eichgerade mit Standardkurve rcIL-4, erstellt durch Sigma-Plot 5.0

Die Sensitivität (Nachweisgrenze/Empfindlichkeit) ist per definitionem die geringste Konzentration an rcIL-4, die noch eine deutlich höhere Extinktion (OD) als der Nullwert/Leerwert hervorruft.

Anhand der Standardkurve läßt sich die Sensitivität des ELISA zur Messung caninen IL-4 bestimmen. Sie beträgt 0,1 ng/ml IL-4, was einer Menge von 5 pg Gesamtprotein entspricht. Der etablierte rcIL-4-ELISA mit Verstärkersystem Biotin/Streptavidin erwies sich als geeignet zur Messung der rcIL-4-Konzentration im Zellkulturüberstand der transfizierten CHO- und Knorpelzellen, (s. 4.5.2.2.2.).

4.5. Transfektion

4.5.1. Kultivierung der caninen Knorpelzellen

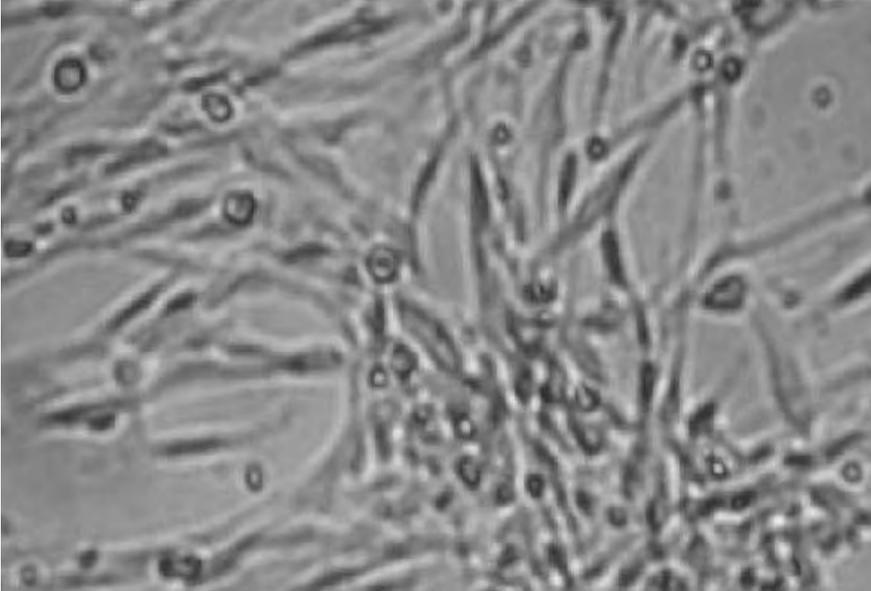


Abb.21: Dedifferenzierte Knorpelzellen in Kultur, 3 Tage nach Aussaat, 200x vergrößert

Die Aussaat der Knorpelzellen erfolgt in der lag-Phase des Wachstums, in der die Zellen runde Zelleiber haben und dem Boden des Kulturgefäßes anhaften. Dabei breiten sie sich aus und werden spindelförmig, fibroblastenähnlich (siehe Abb.21.). Nach Anpassung an die Wachstumsbedingungen folgt die exponentielle Wachstumsphase, in der die Zellen bei optimalen Bedingungen eine maximale Teilungsrage zeigen. Drei bis vier Tage nach Aussaat hat sich ein konfluenter Zellrasen gebildet, und die Zellen treten in die stationäre Wachstumsphase ein.

4.5.2. Transfektion der CHO- und Knorpelzellen

Es stehen zahlreiche kommerziell erhältliche Liposomengemische zur liposomenvermittelten Transfektion zur Verfügung.

Die Entscheidung fiel für die Transfektion mit LipofectAMINE-PLUSTM (invitrogen, Karlsruhe), da dieses Reagenz zur Transfektion von DNA in eukaryotische Zellen geeignet ist (HAWLEY-NELSON et al., 1993). Die Transfektionsaktivität kann durch Zugabe des PLUS-Reagenz noch gesteigert werden (SHIH et al., 1997), um die DNA vorzukomplexieren, bevor die Transfektionskomplexe hergestellt werden.

Bei LipofectAMINE handelt es sich um ein 3:1 (w/w) Lipidgemisch aus dem polykationischen Lipid-2,3-dioleyloxy-N-[2(sperminecarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium trifluoroacetate (DOSPA) und dem neutralen Lipid Dioleoyl phosphatidylethanolamine (DOPE). Die CHO-Zellen und die beiden Knorpelzellkulturen wurden jeweils nach der optimierten Methode transfiziert (s.o.).

Als DNA diente zum einen das Plasmid pEGFP-C1 (Clontech) für die Kontrolle der Transfektion mittels Fluoreszenzmikroskopie.

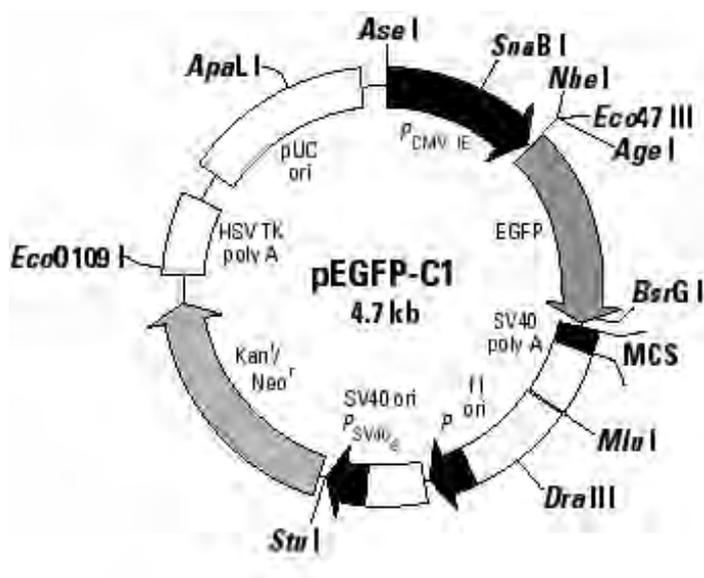


Abb.22: pEGFP-C1-Plasmid (Clontech, Heidelberg)

Zum anderen wurden die drei Zellkulturen mit zwei Klonen (C2 und C3) des Plasmides pcDNA3.1-rcIL-4 (invitrogen, WONDIMU et al., 2001) transfiziert.

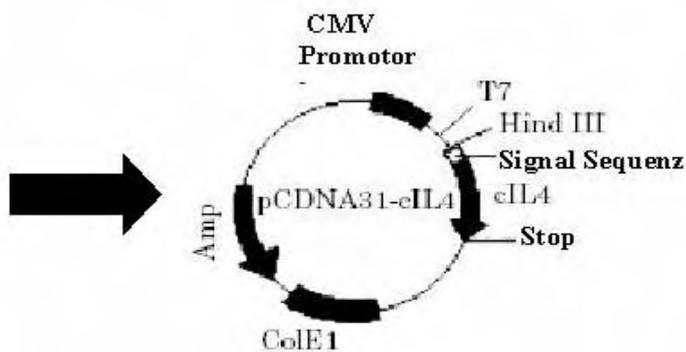
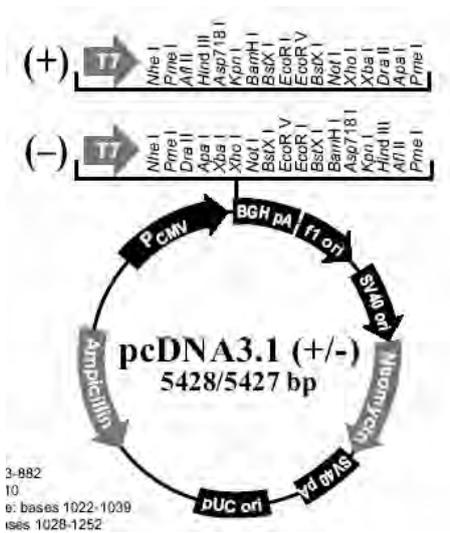


Abb.23: oben: Plasmid pcDNA3.1 (invitrogen, Karlsruhe)
 unten: Expressionsklon pcDNA3.1-cIL-4 nach Restriktionsklonierung (WONDIMU et al., 2001)

4.5.2.1. Optimierung der Transfektion mit pEGFP-cIL-4

Um eine Optimierung der Transfektion mit dem TransfektionsKit LipofectAMINE-PLUS™ bei den CHO- und Knorpelzellen optisch sichtbar zu machen, wurde das Plasmid pEGFP-cIL-4 eingesetzt. Die Transfektionsbedingungen waren immer die gleichen.

	1	2	3	4	5	6	DNA	PLUS Reagenz
A						+	0,1 µg	1 µl
B				(+)	+		0,2 µg	2 µl
C			(+)	++	+++	+++	0,4 µg	4 µl
D			+	++	+++	+++	0,8 µg	8 µl
LipofectAMINE	0,5 µl	1,0 µl	2,0 µl	3,0 µl	4,0 µl	5,0 µl		

Die höchste Transfektionseffizienz war zu erkennen in Vertiefung C5/C6 und D5/D6. Um Material zu sparen, wurde die Konzentration an Transfektionsreagenz gewählt, die bei geringem Materialverbrauch noch deutlich erkennbare gute Transfektionsergebnisse lieferte:

DNA : **0,4 µg**

PLUS-Reagenz: **4 µl**

LipofectAMINE: **4,0 µl**

Diese Mengenangaben gelten für alle folgenden Transfektionen.

Zuerst wurden das LipofectAMINE-Reagenz und die Plasmid-DNA in Medium (RPMI, serumfrei, da sonst die Transfektion beeinträchtigt werden könnte) vorverdünnt. Zu dem Verdünnungsansatz der Plasmid-DNA wurde das PLUS-Reagenz gegeben, um die DNA vorzukomplexieren. Danach wurden beide Ansätze zusammengegeben, 15 min inkubiert und daraufhin auf die Zellen (1×10^5 / Vertiefung) gegeben. Nach drei Stunden Inkubation wurden die Vertiefungen mit serumhaltigem Medium aufgefüllt und für 48 h in den Brutschrank gestellt. Für den Nachweis mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde das Medium abgesaugt und verworfen. Die Glasplättchen, auf denen die Zellen gewachsen sind, wurden auf Objektträger fixiert, wie unter 3.2.20. genau beschrieben.

Um die Transkripte mit der PCR-Technik nachzuweisen, wurde die m-RNA mit Hilfe des Tri-Star-Reagenzes extrahiert.

Für den ELISA wurde der Zellkulturüberstand abgesaugt und zur Bestimmung eingesetzt.

Ergebnisse

Beurteilt wurden jeweils 10 Gesichtsfelder/ Vertiefung. Somit konnte man eine Transfektionseffizienz von ca. 35%, sowohl bei den CHO-Zellen, wie auch bei den Knorpelzellen erkennen.

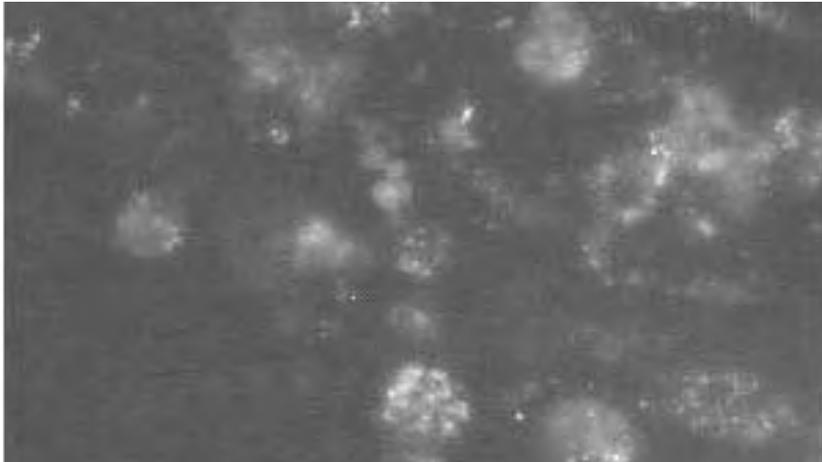


Abb.24: Knorpelzellen (KnI), transfiziert mit dem Plasmid pEGFP-cIL-4 mittels LipofectAMINE-PLUS-ReagenzTM, 500 x vergrößert

Der Nachweis mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde lediglich zur vorangegangenen Optimierung und zur qualitativen Kontrolle der Transfektion herangezogen.

4.5.2.2. Transfektion mit pcDNA3.1-cIL-4

4.5.2.2.1. Nachweis der mRNA-Transkripte mittels RT-PCR

Einen qualitativen Beweis für die erfolgreiche Transfektion der CHO- und Knorpelzellen mit dem Zytokinen liefert die RT-PCR der mRNA-Transkripte der transfizierten Zellen.

Es wurden zwei verschiedene Expressionsklone (C2 und C3) des Plasmides pcDNA3.1-cIL-4 bei der Transfektion eingesetzt. Transfiziert wurden hier wieder die Knorpelzellkulturen KnI und KnII sowie die CHO-Zellen nach optimierter Methode.

Die Transkripte wurden mit dem TriStar-Reagenz extrahiert.

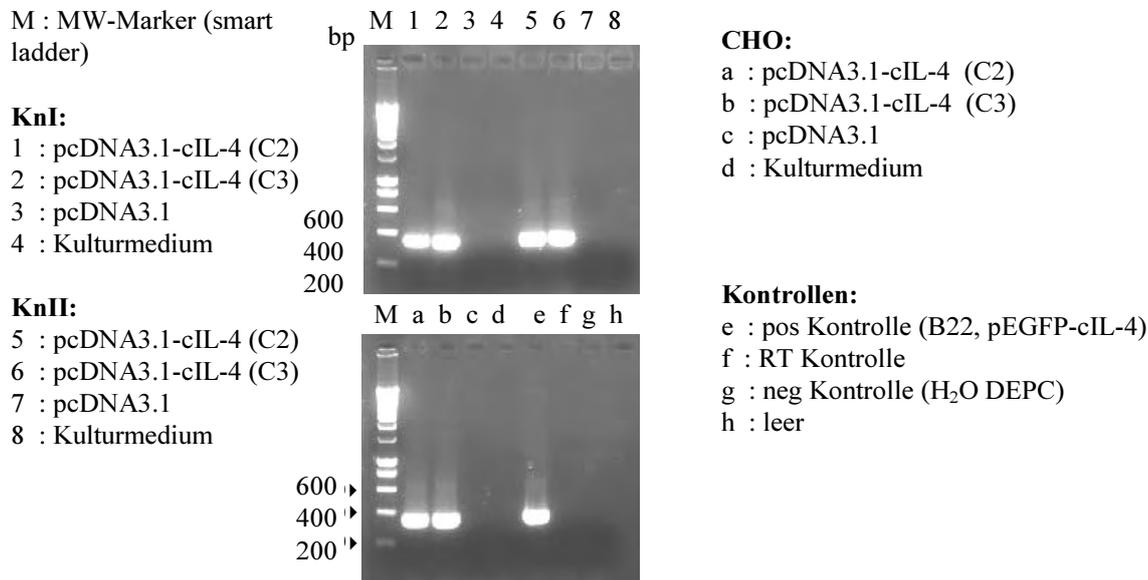


Abb.25: RT-PCR der transfizierten CHO-Zellen und Knorpelzellen

4.5.2.2.2. Nachweis des exprimierten rekombinanten IL-4 im rcIL-4-ELISA mit Verstärkersystem Biotin/Streptavidin

Transfiziert wurden ca. 1×10^5 Zellen/ Vertiefung der CHO-Zellen und der zwei Knorpelzellkulturen KnI und KnII.

Als Vektoren wurden zwei Expressionsklone pcDNA3.1-cIL-4 (C2) und (C3) eingesetzt und als Negativkontrollen dienten das Plasmid pcDNA3.1 ohne Insert von IL-4 und das native RPMI-Medium.

Die Zellkulturüberstände wurden unverdünnt auf den Biotin/Streptavidin-Sandwich-ELISA gegeben, s. 3.2.21.2. und die Konzentration anhand der Standardkurve berechnet.

Die höchsten Konzentrationen an rcIL-4 von bis zu 260 ng/ml im Zellkulturüberstand konnten nach Transfektion mit dem Vektor pcDNA3.1-cIL-4 (C3) bei der Knorpelzellkultur KnII gemessen werden.

Vektor	Kn I* (ng/ml)	Kn II* (ng/ml)	CHO (ng/ml)
pcDNA3.1-clL4 (C2)	69,684 ± 0,32	183,454 ± 0,58	171,942 ± 5,087
pcDNA3.1-clL4 (C3)	89,14 ± 1,92	252,3 ± 8,703	150,36 ± 4,579
pcDNA3.1	-	-	-
Kontrollmedium	-	-	-

* K = Knorpelzellen von Patient I und II

Abb.26: Messung des rcIL-4-Gehaltes der Zellkulturüberstände der transfizierten Knorpelzellen (KnI und KnII) und der CHO-Zellen mittels des rcIL-4-ELISA mit Verstärkersystem Biotin/Streptavidin. Angegeben sind die Mittelwerte jeweils dreier Vertiefungen (n=3).

Es zeigte sich, daß nach der Transfektion der Knorpelzellen Kn II mehr als doppelt so hohe rcIL-4-Gehalte im Zellkulturüberstand gemessen werden konnten als bei der Knorpelzellkultur KnI.