

## Inhaltsverzeichnis

<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1 Einführung in die Thematik</b> .....	<b>2</b>
<b>1.1. Einteilung der Arthritiden</b> .....	<b>2</b>
1.1.1. Immunbedingte Arthritiden .....	3
1.1.2. Nichterosive Formen .....	3
1.1.3. Erosive Formen .....	4
<b>1.2. Rheumatoide Arthritis</b> .....	<b>4</b>
<b>1.3. Therapieansätze bei der rheumatoiden Arthritis</b> .....	<b>8</b>
1.3.1. Glukokortikoide.....	8
1.3.2. Nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) .....	8
1.3.3. Disease modifying antirheumatic drugs (DMARD) .....	9
1.3.3.1. Traditionelle DMARDs.....	9
1.3.3.2. Biologische DMARDs.....	10
1.3.4. Lokale Therapie.....	11
1.3.5. Physikalische Therapie.....	12
<b>1.4. Canine rheumatoide Arthritis als potentielles Tiermodell</b> .....	<b>12</b>
<b>1.5. Zytokine</b> .....	<b>14</b>
1.5.1. Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) .....	14
1.5.2. Interleukin-1.....	15
1.5.3. Interleukin-4.....	15
<b>2 Problemstellung</b> .....	<b>17</b>
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>18</b>
<b>3.1. Material</b> .....	<b>18</b>
<b>3.2. Methoden</b> .....	<b>20</b>
3.2.1. Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i> ( <i>E.coli</i> ) .....	20
3.2.2. Transformation der Bakterien .....	21
3.2.3. Isolierung der Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> .....	21
3.2.4. Restriktionsverdau .....	22
3.2.5. Agarosegelelektrophorese .....	23
3.2.6. Klonierung der caninen IL-4 cDNA und Isolierung des caninen IL-4 Proteins... 23	
3.2.7. Produktion von IL-4 in <i>E.coli</i> .....	25
3.2.8. Reinigung von His-tagged caninem IL-4.....	25
3.2.9. Überprüfung der Bioaktivität von IL-4.....	26
3.2.10. Proteinbestimmung nach Bradford .....	26
3.2.11. Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	26
3.2.12. Färbung nach Coomassie .....	27
3.2.13. Westernblot .....	27
3.2.14. Polyklonale Antikörper .....	28
3.2.14.1. Gewinnung der polyklonalen Antikörper.....	28
3.2.14.2. Reinigung von IgG mittels einer Protein A-Säule .....	28
3.2.15. Monoklonale Antikörper .....	29
3.2.15.1. Hybridomzellgewinnung.....	29

3.2.15.2. Definition Myelom(zellen) .....	32
3.2.15.3. Anzucht .....	32
3.2.15.4. Selektion der Hybridomzellklone .....	32
3.2.15.5. Isotypisierung der Antikörper .....	32
3.2.16. Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) als permanente Zelllinie .....	33
3.2.17. Knorpelzellen .....	33
3.2.17.1. Gewinnung des Knorpels und Verdau .....	34
3.2.17.2. Ermittlung der Zellzahl .....	35
3.2.17.3. Zellkultivierung .....	36
3.2.18. Gefrierkonservierung von Zellen .....	36
3.2.19. Optimierung der Transfektion mit LipofectAMINE-PLUS™ .....	36
3.2.20. Fluoreszenzmikroskopie mit Green Fluorescent Protein (GFP) .....	39
3.2.21. Nachweismethoden rc-IL-4.....	40
3.2.21.1. Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	40
3.2.21.1.1. RNA-Extraktion .....	41
3.2.21.1.2. Synthese der cDNA aus RNA.....	41
3.2.21.1.3. Oligonukleotidprimer für IL-4 .....	41
3.2.21.1.4. PCR .....	42
3.2.21.1.5. Agarose-Gelelektrophorese .....	42
3.2.21.2. ELISA.....	42
<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>48</b>
<b>4.1. Gewinnung des rekombinanten IL-4.....</b>	<b>48</b>
<b>4.2. Gewinnung polyklonaler Antikörper gegen IL-4 .....</b>	<b>48</b>
4.2.1. Aufreinigung der polyklonalen Antikörper .....	49
<b>4.3. Herstellung der monoklonalen Antikörper gegen canines IL-4.....</b>	<b>50</b>
4.3.1. Kontrolle der Fusionsansätze auf Antikörpergehalt.....	51
4.3.2. Gesamt-IgG-Bestimmung der Zellkulturüberstände und anschließende Isotypenbestimmung .....	52
<b>4.4. Entwicklung des direkten Sandwich-ELISA.....</b>	<b>55</b>
4.4.1. Optimierung des Testsystems zum Nachweis der Expression von IL-4.....	55
4.4.1.1. Einfluß der Konzentration des Beschichtungsantikörpers (Capture Antibody) auf die Meßergebnisse.....	55
4.4.1.2. Erprobung unterschiedlicher Beschichtungspuffer.....	57
4.4.1.3. ELISA mit Verstärkersystem Biotin/ Streptavidin .....	58
4.4.1.3.1. Sensitivitätssteigerung des ELISA.....	58
4.4.1.3.1.1. Ermittlung der optimalen Konzentration des mit Biotin gekoppelten zweiten Antikörpers.....	59
4.4.1.3.1.2. Optimale Konjugatverdünnung .....	60
4.4.1.3.2. Berechnung der Sensitivität des ELISA .....	61
<b>4.5. Transfektion.....</b>	<b>62</b>
4.5.1. Kultivierung der caninen Knorpelzellen .....	62
4.5.2. Transfektion der CHO- und Knorpelzellen .....	62
4.5.2.1. Optimierung der Transfektion mit pEGFP-cIL-4 .....	64
4.5.2.2. Transfektion mit pcDNA3.1-cIL-4.....	66

4.5.2.2.1. Nachweis der mRNA-Transkripte mittels RT-PCR.....	66
4.5.2.2.2. Nachweis des exprimierten rekombinanten IL-4 im rcIL-4-ELISA mit Verstärkersystem Biotin/Streptavidin .....	67
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>69</b>
5.1. Entwicklung eines direkten Sandwich-ELISA zur Detektion von caninem IL-4 .....	69
5.2. Transfektion.....	70
5.3. Gentherapeutischer Ansatz im Zusammenhang mit der RA .....	72
5.4. Vorarbeiten im IMB.....	75
<b>6 Ausblick .....</b>	<b>76</b>
<b>7 Zusammenfassung .....</b>	<b>77</b>
<b>8 Summary.....</b>	<b>79</b>
<b>9 Abkürzungen und Glossar.....</b>	<b>81</b>
<b>10 Literatur .....</b>	<b>85</b>
<b>11 Selbständigkeitserklärung .....</b>	<b>115</b>
<b>12 Lebenslauf .....</b>	<b>116</b>
<b>13 Veröffentlichungen .....</b>	<b>117</b>
<b>14 Danksagung.....</b>	<b>118</b>