

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Entzündungsmodell

Die Versuche werden mit männlichen Wistar-Ratten mit einem Gewicht zwischen 170-220 g durchgeführt. Die Tiere stammen aus der Zucht des Institutes für Infektionsmedizin, Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, Kramerstr. 6, 12207 Berlin. Sie werden in einem 12 h-Tag-12 h-Nacht-Rhythmus gehalten und haben freien Zugang zu Wasser und Standardtrockenfutter. Die Raumtemperatur liegt zwischen 20-25 °C. Die Tiere werden im Rahmen der allgemeinen Kontrollen regelmäßig auf Infektionserreger untersucht. Die Tierversuche wurden vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und Technische Sicherheit Berlin genehmigt (Aktenzeichen REG 0072/02 genehmigt 26.07.2002 und REG 0246/03 genehmigt 20.02.2004). Die Versuchsprotokolle entsprechen den Leitlinien der International Association for the Study of Pain⁴⁰. Alle Eingriffe werden in Halothan- bzw. Isofluran- (Abott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) Kurznarkose durchgeführt. Die Ratte wird mittels weniger Minuten andauernder Inhalation von Halothan oder Isofluran betäubt. Hierzu wird sie in einen Glasbehälter mit Deckel gesetzt, welcher auf dem Boden ein Halothangetränktes Tuch enthält. Nachfolgend wird die betäubte Ratte aus dem Glasbehälter genommen, und es werden 150 µl FCA (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) sowie je nach Protokoll andere Substanzen (z.B. MIP-2) in der verlangten Konzentration subkutan in den zentralen plantaren Bereich der rechten Hinterpfote injiziert.

2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.2.1 Funktionsprinzip der konventionellen PCR

Mit Hilfe der PCR kann man kleine Mengen an Desoxyribonukleinsäure (DNA) durch exponentielle Vervielfältigung spezifisch nachweisen. Die Struktur der nachzuweisenden DNA muss bekannt sein, da man zur Vervielfältigung Primer anwendet. Primer sind kurze komplementäre DNA-Stücke, die an einzelsträngige Ziel-DNA binden. Sie dienen als Ansatzpunkt für das Enzym (Taq-Polymerase), das die DNA kopiert. Jeder Primer hat eine spezifische Sequenz, die nur an eine ganz bestimmte Stelle der zu vervielfältigenden Ziel-DNA bindet, so dass nur das gewünschte DNA-Stück verdoppelt werden kann. Die Taq-Polymerase stammt aus einem thermophilen Bakterium. Sie wird selbst bei hohen Temperaturen, wie z.B. 95 °C beim Schmelzen der DNA, nicht denaturiert und bleibt somit in allen Zyklen der

PCR funktionsfähig. Die PCR hat einen 3-Phasen-Zyklus. Zunächst werden die DNA-Proben auf 95 °C erhitzt, so dass die Wasserstoffbrückenbindungen der doppelsträngigen DNA gelöst werden und man zwei Einzelstränge erhält (Schmelzen der DNA). An diese Einzelstränge bindet das spezifische Primer-Paar (Annealing), so dass die Taq-Polymerase im nächsten Schritt ausgehend von dem Primer-Paar den komplementären Strang synthetisieren kann (Elongation). Nach einem Zyklus der PCR erhält man somit wieder einen Doppelstrang. In mehreren Zyklen steigt die Anzahl der gewonnenen PCR-Produkte exponentiell an. Die Temperatur zum Annealing und zur Elongation ist abhängig von der Länge und Zusammensetzung der Primer bzw. der zu vervielfältigenden DNA. Je nach Gehalt an Cytosin bzw. Guanosin, die beide über 3 Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verbunden sind, und Adenosin bzw. Thymin, die nur über 2 Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verbunden sind, verändert sich die Temperatur, die nötig ist, um die DNA-Stränge voneinander zu lösen (Melting-temperature bzw. Schmelztemperatur).

2.2.2 Funktionsprinzip der Light Cycler-PCR

Im Unterschied zur konventionellen PCR findet die Vervielfältigung der DNA in Glaskapillaren statt. Mit Hilfe einer Heizspirale wird die Luft im Light Cycler erhitzt, womit die erzeugte Wärme wesentlich schneller auf die Kapillaren übertragen werden kann. Dadurch wird die Dauer der PCR von ca. 4 h auf ca. 20 min gekürzt. Die DNA wird in einem 4-Stufen-Zyklus vervielfältigt, bestehend aus 30 s bei 95 °C, einer Primer-spezifischen Anbindungsphase, Elongation und abschließender Messung der Fluoreszenz. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green wird durch einen Laserstrahl angeregt und emittiert nach Bindung an doppelsträngige DNA bei 530 nm. Ungebundenes SYBR Green hat nur eine schwache Fluoreszenz, die als Hintergrundstrahlung vernachlässigt werden kann. Der Vorteil dieses Systems besteht darin, dass nach jedem einzelnen abgelaufenen PCR-Zyklus die Fluoreszenz, d.h. die Menge an vervielfältigter DNA bestimmt wird. Nach dem letzten Zyklus wird durch Erhitzen auf 95 °C alle DNA denaturiert, bei 55 °C wieder zusammengefügt und durch langsames Erhitzen von 55 °C auf 95 °C erneut denaturiert. Dabei wird in 0,2 °C-Abständen die Fluoreszenz gemessen und als Schmelzkurve dargestellt. Jedes PCR-Produkt hat seine eigene spezifische Schmelzkurve, abhängig von der DNA-Zusammensetzung (Cytosin bzw. Guanosingehalt) und der Länge des PCR-Produktes. Die produktspezifische Schmelztemperatur ist definiert als die Temperatur, bei der die Hälfte der DNA als Doppelstrang und die Hälfte der DNA als Einzel-

strang vorliegt. Um diese Temperatur zu bestimmen wird das Integral der Schmelzkurve gebildet, wobei der Maximalwert am Umkehrpunkt der Schmelzkurve liegt. In Pilotexperimenten wird die Temperatur kurz unterhalb der produktspezifischen Schmelzkurve bestimmt. Diese Temperatur wird als Fluoreszenzmessungstemperatur (T_m) verwendet. Bei einer Messung direkt nach der Elongationsphase würden auch unspezifische kleinere PCR-Produkte, z.B. Primerdimere, mitgemessen und somit die Genauigkeit der Messung eingeschränkt. Bei der Light Cycler-PCR mit Fast Start besteht der erste Schritt des Vervielfältigungszyklus in einer 10-minütigen Vorinkubation bei 95 °C, um das Enzym (Fast Start Taq-Polymerase) zu aktivieren. Fast Start Taq-Polymerase ist eine modifizierte Form der hitzestabilen Taq-Polymerase, die bei Raumtemperatur durch hitzelabile blockierende Gruppen an einigen Aminosäureenden des Enzyms in inaktivem Zustand vorliegt. Diese Blockade wird durch die Vorinkubation aufgehoben. Das Enzym wird daher erst nach dem Start des entsprechenden Light Cycler-Programmes aktiviert, so dass keine Elongation stattfindet so lange die Primer noch unspezifisch binden.

2.2.3 Entnahme des Pfortengewebes und des Rückenmarkes

Die Ratten werden zu bestimmten Zeitpunkten nach Entzündungsbeginn mit einer Überdosis Halothan oder Isofluran getötet. Das entzündete Pfortengewebe wird von plantar entnommen: nach einem queren Schnitt distal des Calcaneus und zwei Längsschnitten seitlich entlang der Fellgrenze wird das Gewebe mit einem Skalpell unter Zug von der tiefen Beugersehne abpräpariert, wobei diese in situ belassen wird. Das subkutane Pfortengewebe wird von der Kutis abpräpariert und gewogen. 25-35 mg werden in TRIZOL[®]-Reagens (Invitrogen; Paisley, Schottland) mit Destroys (Biozym; Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland) zerkleinert, so dass keine größeren Fragmente in der Suspension erkennbar sind.

Zur Entnahme des Rückenmarkes werden die Ratten mit einer Überdosis Halothan oder Isofluran getötet. Die thorakale und lumbale Wirbelsäule wird in einem Stück entnommen. Das Rückenmark wird aus dem Wirbelkanal gespült. Der lumbale Teil des Rückenmarkes, erkennbar durch eine Aufweitung, wird mit dem Skalpell abgetrennt und stumpf in eine rechte und eine linke Hälfte geteilt. Diese beiden Hälften werden für einige min auf Trockeneis gelegt, damit man den Hinterhornbereich der jeweiligen Seite mit dem Skalpell vom Vorderhornbereich trennen kann (ca. 1/3 der Rückenmarkshälfte). Zur Orientierung am Rückenmark dient der ventral sichtbare

Sulcus. Die Hinterhornbereiche werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert. Der Hinterhornbereich wird in TRIZOL[®] mit einem Pistel zerkleinert, bis eine homogene Suspension entsteht.

2.2.4 RNA-Isolation und cDNA-Synthese

Ribonukleinsäure (RNA) ist instabil und kann durch Ribonukleasen zerstört werden. Deswegen wird die im Gewebe vorhandene mRNA mit Hilfe von Reverser Transkriptase in stabile, so genannte copy DNA (cDNA) umgeschrieben:

TRIZOL[®] bricht die Zellen auf, wobei Proteine, RNA und DNA erhalten bleiben. Die Proben werden 15 s gemischt und bei Raumtemperatur 5 min stehen gelassen. Anschließend wird Chloroform-Isoamylalkohol (49:1; beide SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) hinzugegeben, 15 s gemischt und bei Raumtemperatur 3 min stehen gelassen. Nun werden die Proben bei 15.000 g, 4 °C für 30 min zentrifugiert. Die Behandlung mit Chloroform führt zur Auftrennung in eine wässrige Phase, die ausschließlich die RNA enthält, und eine organische Phase, die DNA und Proteine enthält. Die wässrige Phase wird abgenommen, mit Isopropanol zum Ausfällen der RNA (SIGMA-Aldrich) vermischt und über Nacht bei -20 °C gelagert.

Die Proben werden bei 15.000 g, 4 °C für 30 min zentrifugiert, dekantiert, nochmals zentrifugiert und dekantiert, in 75 %-Ethanol („Baker analyzed“ Reagent Mallinckrodt, Baker B.V. Deventer, Niederlande) aufgenommen, 15 s gemischt und zentrifugiert. Abschließend wird nochmals bei 15.000 g, 4 °C für 30 min zentrifugiert, dekantiert und die Proben im Vakuumkonzentrator ohne Wärmezufuhr getrocknet, so dass nur die RNA übrig bleibt. Diese wird mit sterilem Wasser (Aqua ad injectabilia Braun, Melsungen, Deutschland) und oligo-Desoxynukleosidtriphosphat (dT) ($2,5\text{ }\mu\text{M}$; Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) versetzt. Oligo-dT bindet bei 65 °C an den poly-Adenosin-Schwanz, den jede mRNA besitzt. Damit wird vorwiegend die gewünschte mRNA und typischerweise keine Ribosomale RNA (rRNA) oder Transfer RNA (tRNA) amplifiziert. Die Proben werden bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert und mit einer Reaktionsflüssigkeit bestehend aus: Dithiothreitol ($0,01\text{ M}$), Reverse Transkriptase Puffer (5 x), dT (10 mM) ($0,125\text{ }\mu\text{M}$, enthält 100 mM Desoxyadenosintriphosphat (dATP), 100 mM Desoxycytosintriphosphat (dCTP), 100 mM Desoxyguanosintriphosphat (dGTP), 100 mM Desoxythymidintriphosphat (dTTP); Roche Diagnostics), avian myeloblastosis virus Reverse Transkriptase (AMV RT; 10 U), Ribonukleaseinhibitor (4 U , aus humaner Plazenta)

(alle von Roche Diagnostics, außer Dithiotreitol, SIGMA-Aldrich) vermischt. Die Reverse Transkriptase bindet bei 42 °C an oligo-dT und nutzt dieses als Primer, um von dieser Stelle aus mit Hilfe der Desoxynukleosidtriphosphate Kopien der mRNA herzustellen. Die cDNA wird bis zur PCR-Analyse bei -20 °C gelagert.

2.2.5 Anwendung konventionelle PCR und Herstellung eines Standards

Die Reaktionsflüssigkeit bestehend aus sterilem Wasser (Aqua ad iniectabilia Braun), PCR-Puffer (10X), Desoxynukleosidtriphosphat (10 mM), Taq-Polymerase (1 U/ml) (alle von Roche Diagnostics), Primer sense, Primer antisense (10 µM; alle Primer von TIB MOLBIOL, Berlin, Deutschland) wird mit der cDNA vermischt und nach dem entsprechenden PCR-Programm vervielfältigt. Die PCR-Programme sind in Tab. 1 aufgelistet, die verwendeten Primer in Tab. 2.

Ein Standard ist ein spezifisches PCR-Produkt dessen Produktkonzentration bekannt ist. Dieser wird benötigt, um unbekannte Produktkonzentrationen zu berechnen (die Formel zur Berechnung findet sich am Ende dieses Absatzes).

Das Gewebe wird wie unter 2.2.3 beschrieben entnommen und aufgearbeitet.

Zur Vervielfältigung der gewünschten cDNA wird eine konventionelle PCR (wie unter 2.2.1 beschrieben) ausgeführt. Um sicherzustellen, dass hauptsächlich das gewünschte DNA-Produkt vervielfältigt wurde, und keine anderen DNA-Stücke, wird zusätzlich zu dem Produkt ein DNA-Molekulargewichtsmarker XIV (100 basepair (bp) ladder; Roche Diagnostics) auf ein 2 %-Agarosegel aufgetragen. Nach 30 min bei 120 V sind die DNA-Stücke so weit gewandert, dass die einzelnen Banden erkennbar sind. Das Sichtbarmachen erfolgt unter UV-Fluoreszenz. Die einzelnen PCR-Reaktionen werden als späterer Standard zusammengeführt, um die Gesamtmenge an Standard zu erhöhen. Zur Berechnung der Produktkonzentration im Standard wird dieser in Verdünnungen mit dem Molekulargewichtsmarker IX (72-1353 bp; 0,25 µg/µl; Roche Diagnostics) auf einem 3 %-Agarosegel aufgetragen und bei 80 V in 90 min aufgetrennt. Um das PCR-Produkt der konventionellen PCR sichtbar zu machen und zur Semiquantifizierung, wird das PCR-Produkt auf einem Agarosegel (Zusammensetzung unter 2.5) in einem elektrischen Feld nach seiner molekularen Größe und elektrischen Ladung aufgetrennt. Je kleiner das Stück, desto schneller kann es dem elektrischen Feld folgend durch die Maschen des Agarosegels gelangen. Ethidiumbromid, welches dem Gel zugesetzt wird, bindet an doppelsträngige DNA und fluoresziert unter UV-Licht, so dass die verschiedenen Banden der DNA sichtbar werden.

Zur Quantifizierung sucht man in den Verdünnungen gleich stark fluoreszierende Banden von Standard und Molekulargewichtsmarker ähnlicher Länge ⁴¹. Die Berechnung erfolgt nach folgender Formel: (Standard Konzentration) x (% DNA der korrespondierenden Molekulargewichtsmarkerbande) x (Verdünnungsfaktoren Standard vs. Molekulargewichtsmarker) x 1000 = Anzahl der Kopien (ng/μl). Der auf diese Art und Weise quantifizierte Standard wird bei -20 °C gelagert.

2.2.6 Anwendung Light Cyclers-PCR

2.2.6.1 *Verwendung von Light Cyclers DNA Master SYBR Green 1 zur Messung der Chemokine*

Es wird unter Ausschluss von Licht gearbeitet, um das Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes zu verhindern. Die Reaktionsflüssigkeit besteht aus sterilem Wasser (PCR grade), Magnesiumchlorid (MgCl₂) (4 μM), Light Cyclers-DNA Master SYBR Green 1 (1 x), Primer antisense und Primer sense (beide 0,5 μM). Die Reaktionsflüssigkeit wird mit der zu messenden cDNA in eine vorgekühlte Light Cyclers-Kapillare gefüllt. Der Standard der gewünschten cDNA wird in 10-er Schritten mit sterilem Wasser verdünnt und ebenfalls mit der Reaktionsflüssigkeit in die Glaskapillaren gefüllt. Verwendet werden Duplikate von vier aufeinanderfolgenden Verdünnungen, um eine konzentrationsabhängige Standardkurve zu erhalten, mit deren Hilfe der Gehalt an cDNA in den unbekanntenen Proben bestimmt wird. Auch bei der cDNA werden Duplikate vervielfältigt und gemessen. Zur nachfolgenden Berechnung wird der Mittelwert der jeweiligen Duplikate verwendet. Die Glaskapillaren werden bei 700 g für 1 min zentrifugiert und mit dem entsprechenden Light Cyclers-Programm vervielfältigt und gemessen. Die Light Cyclers-PCR-Programme sind in Tab. 1 aufgelistet.

2.2.6.2 *Verwendung von Light Cyclers Fast Start DNA Master Plus SYBR Green 1 zur Messung von c-fos*

Der Unterschied der beiden verwendeten Light Cyclers-Kits besteht darin, dass das Enzym von Fast Start bei Raumtemperatur inaktiviert ist und erst nach einer 10-minütigen Inkubationszeit bei 95 °C aktiviert wird. Dadurch werden unspezifische Primerbindungen vor dem Starten der PCR verhindert.

Zunächst wird unter Ausschluss von direktem Lichteinfall ein Master-Mix hergestellt. Dazu werden 14 μl Enzym (Fast Start Taq-DNA-Polymerase) zur Reaktionsmischung, bestehend aus Reaktionspuffer, MgCl₂, SYBR Green 1 und Desoxynukleotidtriphosphaten mit Desoxyuraciltriphosphat (dUTP) anstelle von dTTP pi-

pettiert (genaue Konzentrationen der einzelnen Komponenten werden vom Hersteller nicht angegeben). Die für die PCR benötigte Reaktionsflüssigkeit besteht aus Master-Mix (5 x), Wasser (PCR grade), Primer antisense und Primer sense (10 μ M, alle von TIB MOLBIOL). Alle weiteren Schritte erfolgen entsprechend zur Vorgehensweise mit dem Light Cycler DNA Master SybrGreen 1 wie unter 2.2.6.1 beschrieben.

Tab.1 PCR-Konditionen, Light Cycler-PCR und konventionelle PCR (in Klammern)

	RPL-19	KC	MIP-2	LIX	CINC-2	C-FOS
NIH-Zugangsnummer	X82202	U85628	X65647	U90448	D87927	X06769
Anzahl der Zyklen	29 (30)	35 (40)	33 (40)	40 (40)	35 (40)	30 40)
Anbindungstemperatur (°C)	69 (68)	69 (69)	69 (69)	62 (62)	61 (61)	59 (59)
Anbindungszeit (sec)	3 (30)	3 (30)	3(30)	4 (30)	3 (30)	5 (30)
Elongationstemperatur (°C)	72 (72)	72 (72)	72 (72)	72 (72)	72 (72)	72 (72)
Elongationszeit (sec)	14 (30)	8 (30)	5 (30)	7 (30)	9 (30)	5 (30)
Fluoreszenzmessung TM (°C)	89 (72)	87 (72)	85 (72)	79 (72)	87 (72)	86 (72)

Tab.2 PCR Primer

Produkt	Primer sense	Primer antisense
RPL-19	5'AAT CGC CAA TGC CAA CTC TCG	5'TGC TCC ATG AGA ATC CGC TTG
CINC-2	5'CAG CCT TCA GGG ACT GTT G	5'AGC TGG ACT TGT CAC TCT TC
KC	5'AAT GAG CTG CGC TGT CAG TGC	5'TTG GGG ACA CCC TTT AGC ATC
MIP-2	5'CAA CCA TCA GGG TAC AGG GGT	5'GTC CTG GAG GGG TCA CCG T
LIX	5'CCA AGG TGG AAG TCA TAG G	5'GCT TTG TTT TCT TAT TTT CAC TGC
C-FOS	5'GGG ACA GCC TTT CCT ACT ACC A	5'CGT GGG GAT AAA GTT GGC AC

2.3 Zellmigration

Unter Halothan- bzw. Isofluran-Narkose wird eine Thorakotomie durchgeführt, der linke Ventrikel punktiert und 10 ml Blut aspiriert.

Ein Teil des entnommenen Blutes wird für eine Analyse mit dem Durchflusszytometer (Fluorescence Activated Cell Staining, FACS) aufgearbeitet, um die Zusammensetzung der Zellpopulationen zu bestimmen: Das Blut wird mit den gewünschten An-

tikörpern gefärbt (Beschreibung der Antikörperfärbungen vgl. 2.4.2), 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert, mit 1:10 verdünnter FACS-Lysing-Solution (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) gemischt und nochmals für 10 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die FACS-Lysing-Solution lysiert die Erythrozyten und fixiert die Färbung, um in der anschließenden Durchflusszytometrie nur die Antikörpergefärbten Leukozyten nachweisen zu können. Die gefärbten Zellen werden bei 350 g zentrifugiert, dekantiert, in Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS pH 7,4, Life Technologies, Paisley, Schottland) resuspendiert, nochmals zentrifugiert, dekantiert und in PBS aufgenommen.

Das Blut wird 1:1 mit einer entsprechende Menge 3 % Dextran in 0.9 % Natriumchlorid (NaCl) (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Schweden) durchmischt und 90 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dextran führt dazu, dass sich die Erythrozyten in Geldrollenform zusammenlagern und somit schneller sedimentieren, während die Leukozyten im Überstand verbleiben. Der leukozytenreiche Überstand der mit 3 % Dextran sedimentierten Zellen wird abpipettiert, in PBS aufgenommen, 10 min bei 450 g zentrifugiert und in PBS gewaschen. Es folgt zweimal eine hypotone Lyse auf Eis mit 0,2 % NaCl je 30 s und 1,6 % NaCl für 30 s, um verbliebene Erythrozyten zu lysieren. Die Zellen werden 10 min bei 350 g zentrifugiert, dekantiert, in Kompletmedium (Roswell Park Memorial Institute 1640 medium, Life Technologies; Zusammensetzung des Kompletmediums vgl. 2.5) aufgenommen und in einer 1:10-Verdünnung mit Trypanblau unter dem Mikroskop ausgezählt. Trypanblau färbt nekrotische Zellen, da nur bei diesen die Zellmembran für den Farbstoff durchlässig ist. Dadurch ist es möglich, die Anzahl der lebenden Zellen zu bestimmen.

Um die Migrationsfähigkeit von Granulozyten zu untersuchen, werden diese in eine Boyden-Kammer (Costar, Bodenheim, Deutschland) gebracht. Diese Kammer hat ein einsetzbares Zellsieb, das sie in zwei Kompartimente teilt. Das Sieb besteht aus einer dünnen Polyestermembran, durch die die Zellen migrieren können. Das Chemokin MIP-2 (PeproTech, London, England) wird in Kompletmedium aufgenommen und in verschiedenen Dosierungen in den unteren Teil der Boyden-Kammer gefüllt. Der obere Anteil der Kammer enthält die gewonnen Granulozyten (4×10^5 Zellen pro 100 μ l Kompletmedium). Nach einer Inkubation von 60 min bei 37 °C und unter 5 % CO₂ wird die migrierte Zellsuspension aus dem unteren Teil der Boyden-Kammer entnommen, mit Antikörpern gefärbt (siehe 2.4.2) und mit Hilfe von TruCOUNT™ Beads (BD Biosciences) im Durchflusszytometer quantifiziert (siehe 2.4.3).

2.4 Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Staining, FACS)

Zellen werden mit fluoreszierenden Antikörpern gefärbt. Es gibt Antikörper, die Oberflächenproteine markieren und Antikörper, die nach einer Permeabilisation der äußeren Zellmembran intrazelluläre Proteine markieren. Die Antikörper sind an unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt, d.h. nach Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes mit einem Laser einer bestimmten Wellenlänge absorbiert dieser einen Teil der Energie und gibt die absorbierte Energie in Form von Schwingungen, Wärme und Photonen längerer Wellenlänge (Fluoreszenz) wieder ab. Diese emittierte Fluoreszenz ist spezifisch für den jeweils verwendeten Farbstoff. Fluorescein Isothiocyanat (FITC) emittiert bei 530 nm, Phycoerythrin (PE) bei 575 nm und CyChrome (bestehend aus Cy5 und Phycoerythrin) bei 682 nm. Im Durchflusszytometer werden die Zellen in einer Trägerflüssigkeit einzeln durch die Messküvette geleitet und mit einem Laser bestrahlt. Der Laserstrahl fällt auf die Zelle, was dazu führt, dass Streulicht in Richtung des eingefallenen Laserstrahls (Forward scatter, FSC, Vorwärtsstreulicht) und Streulicht im 90 °-Winkel (Sideward scatter, SSC, Seitwärtsstreulicht) abgegeben wird. Das Vorwärtsstreulicht ist ein Maß für die Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht für die Zellgranularität und die Fluoreszenz. Das Gerät ist so konstruiert, dass fünf verschiedene Parameter gleichzeitig gemessen werden können: Zellgröße, Zellgranularität und drei unterschiedliche Fluoreszenzen, die in drei unterschiedlichen Kanälen des Durchflusszytometers gemessen werden.

2.4.1 Gewebeentnahme und Aufbereitung

Die Ratten werden nach der FCA-Injektion mit einer Überdosis Halothan bzw. Isofluran getötet. Das entzündete subkutane Pfotengewebe wird wie unter 2.2.3 beschrieben gewonnen. Das Subkutangewebe wird von der Kutis abpräpariert, gewogen und in 1-2 mm große Fragmente geschnitten. Zum enzymatischen Gewebeverdau werden die Fragmente jeder Pfote in 3 ml Verdaulösung aufgenommen und bei 37 °C für 60 min inkubiert. Die Verdaulösung setzt sich zusammen aus 10 ml Komplettmedium, 30 mg Kollagenase, 10 mg Hyaluronidase und 0,5 ml HEPES, 1 M (alle von SIGMA-Aldrich). Anschließend wird das Gewebe durch ein 70 µm Nylon-Zellsieb (Falcon™, BD Biosciences) gepresst, wobei mit 10 ml Komplettmedium gespült wird. Die Einzelzellsuspensionen werden bei 350 g über 10 min herunterzentrifugiert, dekantiert, in PBS resuspendiert und auf die gewünschte Anzahl von Röhr-

chen aufgeteilt. Diese werden bei 350 g über 5 min herunterzentrifugiert und dekantiert.

2.4.2 Antikörper und Protokolle der Färbung

Die verwendeten Antikörper sind in Tab. 3 aufgelistet. Zur Berechnung der Antikörperkonzentration wird ein Volumen von 50 µl nach dem Dekantieren zugrunde gelegt.

Tab.3 FACS-Antikörper

Bezeichnung	Antigen	Zielzelle	Fluorochrom	Bindungsstelle	Firma	Konzentration
Maus anti-Ratte CD45	Protein Tyrosin Phosphatase (PTP)	Alle hämatopoetischen Zellen	Cy5 (Cy-Chrome)	Extrazellulär	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	2
Maus anti-Ratte RP-1	Nicht charakterisiert	Granulozyten	Phycerythrin (PE)	Intrazellulär	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	12
Maus anti-Ratte ED1	Lysosomales Membranantigen (CD68)	Monozyten/Makrophagen	Fluorescein Isothiocyanat (FITC)	Intrazellulär	Serotec, Oxford, UK	2
Maus IgG _{2a}		Isotypenkontrolle	Phycerythrin (PE)	Intrazellulär	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	20
RAM (Kaniniche anti-Maus) IgG _{2a}		Sekundärer Antikörper	Phycerythrin (PE)	Intrazellulär	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	20
Maus anti-Ratte CD3	T-Zell-Rezeptor assoziiertes Zellmembranprotein	T-Zellen	Phycerythrin (PE)	Extrazellulär	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	4

Alle Antikörperfärbungen werden bei Raumtemperatur und im Dunkeln durchgeführt, um das Ausbleichen der Farbstoffe zu verhindern. Für die Oberflächenfärbung werden die Zellen für 15 min mit den Antikörpern anti-Ratte CD3 PE-Ak und anti-Ratte CD45 CyChrome-Ak inkubiert. Dann werden die Zellen in PBS gewaschen, bei 350 g über 5 min zentrifugiert, dekantiert, in 250 µl PBS aufgenommen und bis zur Durchflusszytometer-Analyse bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

Die Zellen werden in 500 µl 1 % Paraformaldehyd (PFA, Zusammensetzung unter 2.5) für 30 min fixiert. Anschließend werden die Zellen mit je 2 ml PBS gewaschen, bei 350 g über 5 min zentrifugiert, dekantiert, resuspendiert und mit je 2 ml Saponin-Puffer gewaschen. Saponin-Puffer führt zu einer Permeabilisierung der Zellmembran, so dass die Antikörper in die Zelle eindringen und intrazelluläre Strukturen markieren können. Die Zellen werden ein weiteres Mal zentrifugiert, dekantiert, resuspendiert und nach Zugabe der primären intrazellulären Antikörper (anti-Ratte RP-1 PE-Ak, anti-Ratte ED1 FITC-Ak und seiner Isotypenkontrolle IgG_{2a}-Ak) für 30 min inkubiert. Nach dem Waschen mit Saponin-Puffer werden die Zellen gegebenenfalls mit dem sekundären Antikörper Kaninchen anti-Maus IgG_{2a+b} PE-Ak und dem Zelloberflächenmarker (anti-Ratte CD45 CyChrome) inkubiert. Zum Schluss werden die Zellen erst in Saponin-Puffer, dann in PBS gewaschen, um die Poren zu verschließen und bis zur Durchflusszytometer-Analyse in PBS bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

2.4.3 Durchflusszytometrische Analyse

Diese wird durch Mischung der Antikörper-gefärbten Einzelzellsuspension mit in allen Kanälen fluoreszierenden TruCOUNT™ Partikeln erzielt. Nach Aufnahme der Daten von insgesamt 70.000 Ereignissen (bzw. 20.000 Ereignissen bei der Zellmigration) und Durchflusszytometer-Analyse des prozentualen Anteils der Zellpopulation im Verhältnis zu den TruCOUNT™ Partikeln lässt sich daraus die absolute Zellzahl dieser Zellpopulation berechnen. Die Gesamtzahl der CD45⁺ Zellen pro Pfote ergibt sich aus: Suspension (ml) x Anzahl der TruCOUNT™ Partikel x Prozentsatz der Ereignisse im CD45⁺-Gate/ Anzahl der Ereignisse im TruCOUNT™ Partikel-Gate. Beispielsweise errechnet sich so die Gesamtzahl der ED1⁺ Zellen pro Pfote: Gesamtzahl der CD45⁺ Zellen x ED1⁺ Zellen in %/ 100. Die Durchflusszytometer-Daten wurden mit Hilfe der CellQuest Pro Software (BD Biosciences) ausgewertet.

2.5 Verwendete Lösungen und Substanzen

Agarose-Gel: Das 2- bzw. 3 %-Agarose-Gel besteht aus 2 bzw. 3 g Agarose die mit 7 μ l Ethidiumbromid (beide von SIGMA-Aldrich) in 100 ml TBE-Puffer (Zusammensetzung unter 2.5) gelöst und in eine vorgefertigte Kammer mit eingesetzten Kammerkämmen der gewünschten Größe gegossen werden.

TBE-Puffer: Dieser setzt sich zusammen aus 1 l entionisiertem Wasser, 10,8 g Trisma-Base, 5,5 g Borsäure und 0,93 g Ethylendiamintetraessigsäure (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) (alle von SIGMA-Aldrich).

Komplettmedium: Dieses besteht aus 100 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin und 10 % fetalem Kälberserum (alle von Invitrogen, Groningen, Niederlande).

Phosphate buffered Saline (PBS): 10 x PBS (Gibco, Paisley, Schottland) verdünnt im Verhältnis 1:10 mit sterilem Wasser

Paraformaldehyd (PFA): 1 % PFA (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz) wird folgendermaßen hergestellt: Da sich PFA im Alkalischen besser löst, ist es notwendig, zunächst 90 ml PBS mit 1 ml Natronlauge (NaOH 10 M, Fluka) zu alkalisieren, 1 g PFA hinzuzufügen und die Lösung dann unter pH-Kontrolle mit Salzsäure (HCl 11,7 N, SIGMA-Aldrich) zu neutralisieren. Der Ziel-pH ist dabei 7,45.

Saponin-Puffer: Saponin-Puffer besteht aus 0,5 % Saponin, 0,5 % Rinder-Serumalbumin und 0,05 % Natriumazid (NaN_3) (alle von SIGMA-Aldrich) in PBS.

2.6 Geräte

PCR: AB, Applied Biosystems, GeneAmp[®]PCR System 9700, Seriennummer 805S8100577

Light Cycler-PCR: Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland, Seriennummer 1400532

Zentrifugen: Heraeus, Biofuge Fresco, Berlin, Deutschland, Heraeus, Multifuge KR, Berlin, Deutschland, Beckmann, Avanti[™]Y25, Seriennummer JHY98K26, Berlin, Deutschland und Megafuge 2.0 R, Heraeus, Berlin, Deutschland

Vakuumkonzentrator: Speed Vac[®]Plus SC110 A, Seriennummer 01140095, Savant

Zellinkubatoren: Heraeus, Kendro Laboratory Products, Berlin, Deutschland und Function line B 12, Heraeus, Berlin, Deutschland

Durchflusszytometer: FACS Calibur Seriennummer E 4840 der Firma BD Biosciences

2.7 Messung der Schmerzschwellen durch den Hargreaves-Test

Die Hyperalgesie wurde mit Hilfe des Hargreaves-Testes quantifiziert³³. Die Ratte sitzt auf einer Glasplatte, auf der sie sich in einer Kammer frei bewegen kann. Um die Hyperalgesie der Rattenpfote zu bestimmen, wird von unten ein hitzeinduzierender Laserstrahl auf die Metatarsalen der Hinterpfote gesendet und die Zeit in s gemessen, bis das Tier die Pfote wegzieht oder wegläuft. Die Ratte soll dabei zunächst ruhig auf der Glasplatte sitzen, damit sie sich nur bewegt, wenn der Laserstrahl Schmerzen verursacht. Um das zu erreichen werden die Versuchstiere an vier aufeinanderfolgenden Tagen jeden Tag aus dem Käfig in die Hand genommen und für 15 min an die Kammer auf der Glasplatte gewöhnt (Handling). Am fünften Tag wird den Ratten unter Halothan- oder Isofluran-Narkose eine Substanz entsprechend dem Versuchsprotokoll subkutan in die rechte Hinterpfote injiziert und nach 2 h die Schmerzempfindlichkeit der Pfote gemessen. Es wird nie länger als 25 s gemessen, um an der Rattenpfote keinen Gewebeschaden zu verursachen (Cut off). Die Messung erfolgt jeweils zweimal an der rechten und an der linken Hinterpfote. Zwischen den einzelnen Messungen liegen mindestens 30 s, um zu verhindern, dass das darauffolgende Messergebnis durch den Einfluss des vorherigen verfälscht wird. Verwendet wird der Mittelwert der beiden Einzelmesswerte.

2.8 Versuchsprotokolle

2.8.1 Chemokin-mRNA-Expression in der entzündeten Pfote

Der Ratte wird wie unter 2.1 beschrieben 150 µl FCA in die rechte Hinterpfote injiziert. Nach 0, 1, 2 und 12 h wird das Pfortengewebe entnommen, die RNA isoliert und cDNA hergestellt (siehe 2.2.4). Die Gruppengröße beträgt $n = 5$ Ratten. Mit Hilfe der Light Cycler-PCR wird die Anzahl der Kopien an ribosomalem Protein L-19 (RPL-19) (Referenzgen) und der Chemokine (KC, CINC-2, MIP-2, LIX) bestimmt. Die Bestimmung erfolgt in Duplikaten, und der Mittelwert wird errechnet. Die Anzahl der Kopien der Chemokine wird pro 10.000 Kopien RPL-19 angegeben.

2.8.2 Migration gegen MIP-2

Bei $n = 5$ Ratten werden wie unter 2.3 beschrieben Blutleukozyten isoliert und deren Migrationsverhalten unter dem Einfluss von MIP-2 in Dosierungen von 10^{-6} - 10^{-10} M im unteren Teil der Boyden-Kammer untersucht. 4×10^5 Blutleukozyten werden in den oberen Teil der Boyden-Kammer gefüllt. Nach einer Inkubation von 60 min wird die migrierte Zellsuspension aus dem unteren Teil der Boyden-Kammer entnommen, mit anti-Ratte CD45 CyChrome-Ak (4

µg/ml) gefärbt und mit Hilfe von TruCOUNT™ Partikeln mit dem Durchflusszytometer quantifiziert (Beschreibung unter 2.4.3). In Vorversuchen (Daten hier nicht dargestellt) wurde gezeigt, dass nur Granulozyten in der Kammer nach MIP-2 Stimulation migrieren, weil der Rezeptor für MIP-2 (CXCR2) nur auf Granulozyten exprimiert wird. Um einen Migrationsindex zu berechnen, wird die Zahl der migrierten Zellen unter dem Einfluss der verschiedenen Konzentrationen von MIP-2 dividiert durch die Anzahl der migrierten Zellen unter Kontrollbedingungen (nur Kompletmedium in dem unteren Teil der Boyden-Kammer).

2.8.3 MIP-2-Injektion in die nicht entzündete Pfote

Bei n = 6-7 Ratten wird wie unter 2.1 beschrieben MIP-2 in steigender Konzentration (1 µg, 3 µg, 10 µg oder 30 µg in 150 µl 0,9 % NaCl gelöst) in die rechte Hinterpfote injiziert. Als Kontrolle dienen 150 µl 0,9 % NaCl. Das Pfortengewebe wird nach 2 h entnommen, aufgearbeitet (siehe 2.2.3) und mit verschiedenen Antikörpern gefärbt: CD45 CyChrome, RP-1 PE, ED1 FITC und CD3 PE (siehe 2.4.2). Die Analyse erfolgt im Durchflusszytometer.

2.8.4 MIP-2-Injektion in die entzündete Pfote

Bei n = 6-7 Ratten wird den Tieren wie unter 2.1 beschrieben 150 µl FCA (Kontrolle) und 1 µg, 3 µg oder 10 µg MIP-2 (in 150 µl NaCl 0,9 %) in die rechte Hinterpfote injiziert. Die Aufarbeitung des Pfortengewebes und Analyse der Zellpopulationen erfolgt wie unter 2.3 bzw. 2.4 beschrieben.

2.8.5 Granulozytendepletion in der entzündeten Pfote

Bei n = 9 Ratten wird den Tieren 18 h vor der FCA-Injektion 80 µl Kaninchen anti-PMN Serum (80 µl anti-PMN; Chemical & Scientific Corporation, Westbury, USA; in 500 µl 0,9 % NaCl) unter Halothan-Narkose in die Schwanzvene injiziert. Die Kontrolltiere (n = 9 Ratten) erhalten IgG Kontrollserum (so genanntes Präimmenserum; SIGMA-Aldrich). Die Aufarbeitung des Pfortengewebes und Analyse der Zellpopulationen erfolgt wie unter 2.2.3 bzw. 2.4 beschrieben.

2.8.6 Thermale Hyperalgesie in der entzündeten und nicht entzündeten Pfote

Pro Gruppe werden n = 6 Ratten wie unter 2.7 beschrieben an den Untersucher und die Umgebung gewöhnt. Am fünften Tag wird der Ratte je nach Gruppenzugehörigkeit unter Halothan- oder Isofluran-Narkose entweder 0,9 % NaCl (Kontrolle), MIP-2 (3 µg), FCA (150

μl), FCA (150 μl) + MIP-2 (3 μg) oder FCA (150 μl) + anti-PMN (80 μl i.v.) injiziert. Während alle intraplantaren Injektionen zeitgleich erfolgen, wird das anti-PMN Serum 18 Stunden vor der intraplantaren Injektion i.v. injiziert. Zwei h nach intraplantarer Injektion wird die Hyperalgesie sowohl der rechten (entzündeten), als auch der linken (nicht entzündeten) Hinterpfote bestimmt. Die Zeit wird zweimal gemessen und der Mittelwert berechnet.

2.8.7 c-fos-mRNA-Expression im Rückenmark bei entzündeter Pfote

Der Ratte wird unter Halothan- oder Isofluran-Narkose entweder 0,9 % NaCl (Kontrolle), MIP-2 (3 μg), FCA (150 μl), FCA (150 μl) + MIP-2 (3 μg) oder FCA (150 μl) + anti-PMN (80 μl i.v.) in die rechte Hinterpfote injiziert (siehe auch 2.8.6). Nach 2 h wird wie unter 2.2.3 beschrieben das Rückenmark der rechten Seite entnommen, die RNA isoliert und cDNA hergestellt (siehe 2.2.4). In der Light Cycler-PCR wird die Anzahl der Kopien an c-fos-mRNA bestimmt. Analog zu den vorherigen Experimenten wird auch hierbei zweimal gemessen und der Mittelwert berechnet.

2.9 Statistische und graphische Auswertung, Software

Zur statistischen Auswertung wird SigmaStat (SPSS Inc., Chicago, USA) verwendet. Alle Werte werden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes angegeben.

Soweit die Werte normalverteilt sind und zwei Gruppen untersucht werden, werden sie mittels t-Test verglichen. Bei nicht normalverteilten Werten wird der Mann-Whitney-Test angewandt. Bei mehr als zwei Gruppen und normalverteilten Werten wird der ANOVA, ohne Normalverteilung ANOVA on ranks benutzt. Ergebnisse mit einem $p < 0,05$ werden als signifikant gewertet.

FACS-Analyse	CellQuest Pro Software	Becton Dickinson Biosciences, USA
Datenerfassung	Microsoft Excel 2000	Microsoft Corporation, USA
Statistik	Sigmastat Version 2.03	SPSS Inc., USA
Grafik	Sigmaplot Version 8.0	SPSS Inc., USA
Literaturverzeichnis	Endnote Plus 2.3.0.2	Niles & Associates Inc., USA
Textverarbeitung	Word 2000	Microsoft Corporation, USA