

3 Material und Methoden

3.1 Zellsparation

3.1.1 Gewinnung der Granulozyten

Perfusorspritze 50 ml	Braun AG, Melsungen, D
Heparin	Rotexmedica GmbH, Trittau
Falconröhrchen	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Dextran	Sigma Chemicals, St. Luis, Mo, USA
PBS-Dulbecco (steril)	Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
w/o Ca ²⁺ /Mg ²⁺ Ficoll-Paque	Biochrom-AG, Berlin, D
Erythrozyten Lysis Buffer	Quiagen, Valencia, CA, USA

Um die Eosinophilen aus dem Blut zu gewinnen, wurden 100 ml venöses Blut von 25 Personen, 12 gesunden und 13 an allergischem Asthma oder allergischer Rhinitis erkrankten Personen, mittels einer mit Heparin versetzten Perfusorspritze abgenommen, zu gleichen Teilen auf 3 Falconröhrchen verteilt, im Verhältnis von 1:10 mit 6%iger Detranlösung versetzt und bei Zimmertemperatur zur Sedimentation der Erythrozyten stengelassen. Nach 45 min. wurde der Überstand abgenommen, im Verhältnis 1:1 mit PBS-Puffer verdünnt und jeweils 20 ml dieser Flüssigkeit mit 15 ml Ficoll unterschichtet und zentrifugiert (40 Minuten, 1500 g).

Der gesamte Überstand wurde nun abpipettiert und verworfen. Die Pellets wurden in PBS-Puffer 2x gewaschen (900 g, 5 min.). Die verbleibenden Erythrozyten wurden durch Erythrozyten Lysis Buffer lysiert, die Granulozyten wiederum 2x mit PBS gewaschen, dieser Vorgang wurde bei Bedarf wiederholt.

3.1.2 Separation der eosinophilen Granulozyten

CD 16 MicroBeads	Miltenyi, Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, D
CD3 MicroBeads	Miltenyi
MidiMacs Magnet	Miltenyi
PBS-Dulbecco (steril)	Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
W/o Ca ²⁺ /Mg ²⁺	
Cell Strainer Falcon	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Nylon 100 µm	

Die Gewinnung der eosinophilen Granulozyten erfolgte mittels der immunmagnetischen Separation nach Miltenyi, bei der durch negative Selektion mittels paramagnetischer MicroBeads, die an spezifische Antikörper gekoppelt sind, die Zellen mit entsprechenden Oberflächenmolekülen (neutrophile Granulozyten, Lymphozyten) mit Hilfe eines starken Magneten (MACS) gezielt von anderen Zellen separiert werden können. Verwendet wurden CD3- und CD49-Antikörper, die an die Oberflächenantigene von Lymphozyten und neutrophile Granulozyten binden, so daß diese Zellen herausgefiltert wurden.

Hierzu wurde das Granulozytenpellet in 500 µl PBS suspendiert und mit 85µl CD16 MicroBeads und 40 µl CD3 MicroBeads versetzt.

Dann wurden die Granulozyten mit den Antikörpern 30 min bei 4°C inkubiert.

Anschließend wurden sie mit 500 ml PBS-Puffer versetzt, durch einen Nylonfilter filtriert und auf die vorher mit PBS gespülte und in einem MidiMACS Magneten eingetzte Säule aufgetragen, wobei die Suspension nochmals mit ca. 1 ml PBS verdünnt wurde. Durch die magnetische Wirkung werden die mit MicroBeads markierten Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten zurückgehalten, während die unmarkierten eosinophilen Granulozyten den Magneten passieren.

3.1.3 Zellzahlbestimmung

CASY Zellsorter

Hierzu wurden 5 µl der gewonnenen Zellsuspension im Verhältnis 1:2000 verdünnt und die darin enthaltenen Zellen mit dem CASY Zellsorter gezählt, wobei nur die Zellen mit einem

Durchmesser von 8,5-10,5 μm , was dem Durchmesser von Eosinophilen entspricht, berücksichtigt wurden. Die graphische Darstellung der Zellzählung gab mit einem Peak in dem genannten Bereich einen groben Hinweis auf die Reinheit der Zellpopulation, da Peaks in anderen Bereichen Zellpopulationen darstellen, die nicht zu den Eosinophilen gerechnet werden können. Die Anzahl der gewonnenen eosinophilen Granulozyten lag in der Größenordnung von 1-10 E6 Zellen/ml Suspension.

3.1.4 Reinheit der Eosinophilen

3.1.4.1 Zytospin

PBS Dulbecco plus $\text{Ca}^{2+}/\text{mg}^{2+}$
 May/Grünwald-Lösung
 Giemsa-Lösung

Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
 Merck, Darmstadt, D

Für den Zytospin wurden 300 μl der Zellsuspension zentrifugiert (800g, 5 Minuten), das Pellet mit 150 μl PBS plus $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ versetzt, und nach dem Einpipettieren in die für den Zytospin vorgesehene Vorrichtung wiederum zentrifugiert (300, 10 Minuten). Anschließend wurde der Objektträger nach der Trocknung nach May-Grünwald/Giemsa gefärbt: Ein fixierter Ausstrich wurde mit konzentrierter May-Grünwald Färbung 3 Minuten bedeckt, dann Aqua dest. zugefügt, nach 1 min abgegossen. anschließend wurde der Objektträger mit verdünnter Giemsa-Lösung 20 Minuten bedeckt gelassen, dann Abspülen der Lösung mit Aqua dest. und Trocknen des Präparats.

3.1.4.2 Durchflußzytometrie

FITC markierte AK (CD16, CD49, Anti-IgG)
 Durchflußzytometer Epic XL

Coulter Immunotech, Brea, Ca, USA
 Coulter, Brea, Ca, USA

Da die Durchflußzytometrie die Möglichkeit bietet, Zellen anhand ihrer Größe und durch die Markierung von spezifischen Oberflächenantigenen mit fluoreszierenden Antikörpern (Fluoresceinisothiocyanat) zu differenzieren, wurde sie zur Bestimmung der Reinheit der

Proben eingesetzt. Die Licht einer Wellenlänge von 503 nm ausstrahlenden FITC-markierten Antikörper werden durch einen Laser detektiert, die Fluoreszenzintensität kann gemessen werden.

Hierzu wurden 2 Rörchen mit je 10 E5 Zellen bei 1000U/min 10 min. lang zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet eines Rörchens wurde mit 10 µl CD16 FITC-markierten Antikörpern gegen den CD16-Rezeptor der Neutrophilen und mit 10µl CD49 FITC-markierten Antikörpern gegen den CD49-Rezeptor, den alle Granulozyten exprimieren, versetzt und 30 min bei 4°C inkubiert. Das zweite Rörchen diente als Kontrollrörchen und wurde mit 10µl fluoreszierendem Anti-IgG-Antikörper versetzt. Anschließend wurden die nicht gebundenen Antikörper mit PBS ausgewaschen, die Pellets mit je 500 µl PBS suspendiert, die Messung im Durchflußzytometer durchgeführt und das Verhältnis von vorhandenen Neutrophilen zur Gesamtzahl der Granulozyten in Beziehung gesetzt.

3.1.5 Viabilität der Eosinophilen

PI (Propidiumjodid)

Sigma, Deisenhofen, D

Durchflußzytometer Epic XL

Coulter, Brea, Ca, USA

Die Viabilität der Eosinophilen wurde ebenfalls mit Hilfe der Durchflußzytometrie bestimmt. Hier wurde ein Pellet von etwa 10 E5 Zellen / ml mit 1µl Propidiumiodid (PI) versetzt, einem Stoff, der rotes Licht der Wellenlänge 610 nm emittiert. Er lagert sich in toten und apoptotischen Zellen an und ist dort intrazellulär in Form eines Fluoreszenzanstiegs nachzuweisen. Das mit PI versetzte Zellpellet wurde 15 Minuten bei 4°C inkubiert und anschließend für die Messung in 500 µl PBS suspendiert.

3.2 Zellkultivierung und Stimulation

Nährmedium:

Medium RMPI 1640	PAA Laboratories GmbH, Linz, A
FKS (fetales Kälberserum)	Gibco BRL, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
(komplementinaktiviert: 30 min. bei 56°C im Wasserbad inkubiert)	
Penicillin / Streptomycin	Biochrom KG
Glutamin	
6-well-Platten Falcon	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Brutschrank BB 6220 CM	Heraeus, Hanau, D
Theophyllin	Euphyllong i.v.-Injektionslösung, Byk Gulden, Konstanz
Dexamethason	Fortecortin, Merck, Darmstadt

Die Eosinophilen wurden in RPMI 1640 Medium mit 10% FKS, 5% Penicillin/Streptomycin in Kultur gehalten, in jeder Schale befanden sich ca 10 E6 Zellen in 1 ml Nährlösung suspendiert. Die Zellen jeder Blutprobe wurden zu gleichen Teilen auf drei Schalen verteilt, die erste Schale enthielt nur die Nährlösung und die Eosinophilen, in die zweite Schale wurde als Stimulans Dexamethasonlösung in einer Konzentration von 0,1 μ M gegeben, und in die dritte Theophyllinlösung in der therapeutischen Konzentration von 0,2 mM. Anschließend wurden die Schalen 18 Std. in einem Brutschrank bei 37°C und 4% CO₂ inkubiert. Dann wurde der Inhalt der Schalen zentrifugiert, der Überstand für die weiteren Messungen verwendet und die im Pellet gesammelten Zellen für die Durchflußzytometrie vorbereitet oder lysiert, um später auch die intrazelluläre Proteinkonzentration messen zu können.

3.3 Messung des Neurotrophingehalts mit ELISA

3.3.1 Lysatherstellung

RIPA-Puffer

1,5 % SDS	Merck, Darmstadt, D
62,5 mM Tris-HCL Puffer, pH 6.8	Sigma, Deisenhofen, D
1% NP40 (Nonident P-40)	Sigma
5% Mercaptoethanol	Sigma
2 mM PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid)	Sigma
Proteaseinhibitor (Aprotinin, Pepstatin, je 1µg/µl)	Sigma
PMSF (0,1M in Ethanol)	Sigma
21 gauche Nadel	Sarstedt, Nümbrecht, D
Sonifier Cell Disruptor	Branson Sonic Power Company Danbury, Connecticut, USA
Eppendorf Zentrifuge	Eppendorf Netheler Hinz GmbH

Die in der Nährlösung suspendierten Zellen wurden in der Eppendorfszentrifuge 10 min. bei 4000 U/min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, während das Zellpellet mit 500 µl RIPA-Puffer und 50 µl eines Proteinaseinhibitors versetzt und 30 min auf Eis inkubiert wurde. Daraufhin wurden die Zellen mit Hilfe einer 21-gauche- Nadel mechanisch ladiert und anschließend die Zellbestandteile mit Hilfe von Ultraschall und unter Zugabe von 10 µl PMSF weiter zerstört. Zur Trennung des Lysats von den zellulären Bestandteilen wurde alles 10 min bei höchster Geschwindigkeit (14000 U/min) bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und der Proteinbestimmung zugeführt, das Zellkernpellet verworfen.

3.3.2 Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay (ELISA)

Waschpuffer:

0,05% Tween 20	Merck, Darmstadt, D
in PBS-Dulbecco	Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
(steril, w/o Ca^{2+} / Mg^{2+})	

Diluent:

0,1% BSA	Sigma, Deishofen, D
0,05% Tween 20	Merck
in Trispuffer	Sigma

Blockierungslösung:

BSA (bovines Serumalbumin)	Sigma
Sucrose	Sigma
in PBS-Dulbecco	Gibco Invitrogen GmbH
(steril, w/o Ca^{2+} , Mg^{2+})	

Substratlösung Pierce TMB Kit	Pierce Perbio Sciences, GmbH, Bonn, D
Streptavidin Peroxidase HRP	Pierce
Schwefelsäure (1M)	Merck
96 Loch Nunc Microtiterplatte	Nunc, Wiesbaden, D
Photometer	Max Microplate reader Molecular Devices Thermo MWG Biotech
Capture-AK	
NGF	MAB256 R&D
BDNF	MAB848 R&D
Detection-AK	
NGF	BAF256 R&D
BDNF	BAF848 R&D

Die Bestimmung der Neurotrophinkonzentration in den Zellysaten und die extrazelluläre Konzentration in den Überständen erfolgte mittels ELISA. Mit Hilfe des ELISA kann eine quantitative Bestimmung des Proteingehalts vorgenommen werden. Das Verfahren beruht auf der Markierung des Proteins mit einem spezifischen capture-Antikörper, der wiederum mit einem biotinierten Detection-Antikörper markiert wird. Nach Zugabe von Streptavidin-Peroxidase, einer Substrat-Lösung und einer Stopp-Lösung kann die Extinktion photometrisch gemessen werden.

Zunächst wurde ein capture-Antikörper gegen das zu messende Neurotrophin in einer für jedes Neurotrophin spezifischen unten angegebenen Konzentration und einer Menge von 100 µl in jedes Loch einer 96-Loch-Mikrotiterplatte einpipettiert. Diese wurde über Nacht bei Zimmertemperatur inkubiert.

Dann wurde der Inhalt abgesaugt und die Platte mehrmals zur Entfernung des nichtadsorbierten Antikörpers mit Waschpuffer (0,05% Tween 20 in PBS, pH 7,4) gewaschen. Zur Blockung unspezifischer Bindungen wurden jeweils 300 µl Blockierungslösung (PBS mit 1% BSA, 5% Sucrose) eingefüllt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurde die Platte erneut mehrmals ausgewaschen, bevor die Proben aufgebracht wurden. Zwecks Doppelbestimmung wurden je 2 Löcher mit je 100µl des Überstandes bzw. der Lysatlösung gefüllt.

Als Vergleichsstandard wurde eine Verdünnungsreihe aus rekombinantem Neurotrophinprotein bekannter Konzentration (NGF: 2000 pg/ml bis 31,25 pg/ml, BDNF 1500 pg/ml bis 15,625 pg/ml), gelöst im Diluent, einpipettiert, außerdem wurde ein Leerwert, bestehend aus dem Diluent, mitgeführt.

Die so bestückte Platte wurde nun 2 Stunden auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend nochmals gewaschen, bevor der an Biotin gekoppelte detection-Antikörper in einer unten angegebenen Konzentration und einer Menge von 100µl/Loch aufgebracht wurde, danach wurde die Platte wiederum 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und ein letztes Mal gründlich ausgewaschen.

Schließlich wurden je 100 µl Streptavidin-Peroxidase-Lösung (Verdünnung 1:20.000 in Diluent) einpipettiert und die Platte nochmals für 20 min. inkubiert.

Anschließend wurden je 100 µl Substratlösung zugegeben und die Platte für ca. 30 min. in einem abgedunkelten Raum inkubiert.

Schließlich wurden je 50µl einer 1M Schwefelsäure dazugegeben, um die Reaktion abzustoppen, dann konnte die Extinktion der Platte im Photometer bei einer Wellenlänge von 450nm gemessen werden. Der Proteingehalt wurde mit Hilfe der bekannten Proteinkonzentrationen der Standardreihe aus den gemessenen Werten errechnet.

Konzentrationen der Antikörper:

Capture-Antikörper:

Anti-NGF: 2µg / ml PBS

Anti-BDNF: 4µg / ml PBS

Detection-Antikörper:

für Anti-NGF: 50 ng / ml

für Anti-BDNF: 50ng / ml

Bei den Lysaten wurde der gemessene Gehalt des jeweiligen Neurotrophins auf den Gesamtproteingehalt der Probe bezogen, da man auf diese Weise die schwankende Zellzahl pro Volumeneinheit Probe nicht berücksichtigen muß. Die Werte wurden in pg / mg Gesamtprotein angegeben.

3.3.3 Gesamtproteinbestimmung

96 Loch Nunc Microtiterplatte	Nunc, Wiesbaden, D
BSA (Bovines Serumalbumin)	Sigma, Deisenhofen, D
Protein Kit BCA (Protein Assay Reagenz $KaCO_3$, KaC_2O_3 , BCG Entwicklungsreagenz, $KaTartrat$ in NaOH, 4% $CuSO_4$)	Pierce, Rockford, IL, USA
Photometer	Thermomax, Molecular Devices, Ca, USA

Das für die Proteinbestimmung verwendete Verfahren beruht auf der sogenannten Biuret-Reaktion, bei der eine Bindung zwischen Kupfer und Protein entsteht.

Die Lysate wurden im Verhältnis 1:10 mit NaCl verdünnt. Von jeder Probe und von einem Standard (BSA) wurden je 10 µl auf die Microtiterplatte pipettiert, mit 200 µl BCA Protein

Assay Reagenz versetzt und bei 37°C 30 Minuten inkubiert. Mit dem Photometer wurde die Extinktion bei 562 nm gemessen. Anschließend wurde aus den Werten mit Hilfe einer Standardkurve, welche mit bekannten Proteinmengen erstellt wurde, der Proteingehalt der Proben errechnet.

Die Proteinmenge wurde in µg / ml Probenlösung gemessen und ging als mg / ml in die Auswertung ein. Dabei wurde die 10fache Verdünnung berücksichtigt.

3.3.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS Version 10 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA), verwendet wurde der nichtparametrische Test für unabhängige Werte (Whitney-Mann U-Test). Die Signifikanzgrenzen wurden mit $p < 0.05$ festgelegt.

3.4 Nachweis der intrazellulären Neurotrophine mittels Durchflußzytometrie

PFA (Paraformaldehyd)	Sigma Aldrich Chemie Taufkirchen, D
Waschpuffer	
PBS	Gibco Invitrogen Cooperation
FKS	Gibco BRL Life Technology
Saponin	Sigma, Deisenhofen, D
AB-Serum	Biotest AG, Dreieich, D
Rabbit-AK gegen NGF, BDNF	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, Ca, USA
Peptidgeblockte AK	Santa Cruz Biotechnology
FITC markierte AK (goat-anti-rabbit)	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West - Grove, PA, USA
Durchflußzytometer Epic XL	Coulter, Brea, Ca, USA

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie können fluoreszierende Antikörper, die an die nachzuweisenden Antigene binden, mittels eines Lasers detektiert werden.

Gemessen wurde hier die Fluoreszenzintensität der FITC-Antikörper, die über einen Zwischenantikörper gebundenen waren an die intrazellulär in den Eosinophilen gelagerten Neurotrophine NGF und BDNF.

Ca. 10 E05 Zellen wurden nach Zentrifugation mit 500 µl Paraformaldehyd (PFA, 4%ig in PBS-Puffer) fixiert und anschließend die restliche PFA-Lösung mit 500 µl saponinhaltigem PBS-Puffer (0,1% Saponin, 2% fetales Kälberserum (FKS)) ausgewaschen. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Anschließend wurden 50 µl AB-Serum, welches 0,025% Saponin enthielt, für die Permeabilisierung und Blockierung hinzugefügt und die Proben 10 min bei 4°C inkubiert.

Daraufhin wurden je 5 µl der entsprechenden Antikörper (rabbit-Anti-NGF, -BDNF) gegen das zu messende Neurotrophin dazugegeben. In die Leerproben wurden 10 µl rabbit-IgG-Kontrolle oder peptidgeblockte Antikörper gegeben.

Nach Inkubation (30 min bei 4°C) und anschließender Zentrifugation und Auswaschen der nicht gebundenen Antikörper mit dem saponinhaltigen PBS wurde jeweils 1 µl eines goat-anti-rabbit-FITC- Antikörpers (Fluoresceinisothiocyanat, emittiert Licht der Wellenlänge 503 nm, 1:200 gelöst in Aqua dest.) dazugegeben und nochmals 20 min bei 4°C inkubiert.

Nach Auswaschen des nicht gebundenen FITC-Antikörpers wurden die Proben mit 500 µl PFA (2%ig in PBS-Puffer) fixiert und im Durchflußzytometer gemessen.

3.5 Nachweis der Neurotrophine im Zelllysate mittels Western blot

Laemmli-Puffer

Glycerin	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Glycerol	Serva
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, Deisenhofen, D
SDS (Dodecylhydrogensulfat)	Merck, Darmstadt, D
Bromphenolblau	Merck

Transfer-Puffer:

2,4 g Tris base	Sigma, Deisenhofen, D
14,2 g Glycin	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
200 ml Ethanol	

ad 1 l Aqua dest.

1 ml 10% SDS

Merck, Darmstadt, D

Laufpuffer: in 5facher Verdünnung zu verwenden

15 g Tris base

Sigma, Deisenhofen, D

72 g Glycin

Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D

5g SDS

Merck, Darmstadt, D

ad 1l Aqua dest, pH 8,8

tTBS (Waschpuffer):

9,68 g Tris base

Sigma, Deisenhofen, D

32 g NaCl

Merck, Darmstadt, D

ad 4 l Aqua dest, pH 7,6

dazu 2 ml Tween 20

Merck

SDS-Page Gel 15%

BioRad, Hercules, Ca, USA

SDS-Page-Gel 7,5%

BioRad

Molecular Weight Standard

BioRad

Rekombinantes Neurotrophin

R&D System Inc., Minneapolis, MN, USA

Nitrozellulosemembran

Schleicher and Schuell, Keene, Nh, USA

Roti-Block (A151.1)

Roth-GmbH, Karlsruhe, D

Tanksystem Mini-V 8.10

Life Technologies

rabbit-polyclonal-anti-human AK

Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, Ca, USA

donkey-anti-rabbit-AK
NJ, USA

Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway,

Chemiluminiszenz ECL

Amersham Life Sciences, Uppsala, Schweden

Autoradiographiefilm Hyperfilm ECL

Amersham Pharmacia biotech, UK limited

Mit der Western blot-Methode können Proteine nach der elektrophoretischen Auftrennung nach ihrem Molekulargewicht mit Hilfe spezifischer Antikörper markiert und mittels einer Chemoluminiszenzreaktion sichtbar gemacht werden.

Zunächst wurde eine Gesamtproteinbestimmung der jeweiligen Lysate durchgeführt wie oben beschrieben.

Jeweils das Lysatvolumen, das 100 µg Protein enthielt, wurde mit Laemmli Puffer auf 50 µl aufgefüllt.

Die Flüssigkeit wurde 5 min bei 99° C im Thermomixer erhitzt und auf ein SDS-Page Gel (15%) aufgetragen.

Als Marker diente ein Molecular Weight Standard, als Positivkontrolle das jeweilige rekombinante Neurotrophinprotein.

Die elektrophoretische Proteinauftrennung dauerte ca. 90 min bei einem Strom von 80mA. Anschließend wurden das Gel und 2 Schwämme, 2 Filterpapiere und eine Zellulosenitratmembran in Transferpuffer äquilibriert und die Proteine mit Hilfe eines aus dem Gel, den Schwämmen, dem Filterpapier und der Nitrozellulosemembran hergestellten Transfersandwichs vom Gel auf die Nitrozellulosemembran transferiert (bei 120 V 37 Minuten).

Schließlich wurden die noch freien proteinbindenden Stellen auf der Nitrozellulosemembran für mehrere Stunden mit Roti-Block-Lösung (10fach verdünnt mit Aqua dest.) geblockt, dann die Membran in tTBS-Waschpuffer mehrmals gewaschen.

Anschließend wurde die Membran erst mit dem verdünnten (1:400) primären polyklonalen rabbit-anti-human-Antikörper für eine Stunde, dann mit über einen Biotin-Avedin-Komplex an horseradish-peroxidase (HRPO) gekoppelten sekundären donkey-anti-rabbit-Antikörper (Verdünnung 1:10000) inkubiert.

Schließlich wurden die Membranen nach dem Chemoluminiszenzverfahren mit Hilfe des ECL-Kits entwickelt und die Banden mittels Belichtung eines Autoradiografiefilms sichtbar gemacht.

3.6 Nachweis der cDNA-Expression für die Neurotrophine mittels PCR

Die PCR bietet die Möglichkeit, bereits auf Transkriptionsebene semiquantitativ die veränderte Synthese von zellulären Proteinen nachzuweisen, indem die aus den Zellen isolierte mRNA in cDNA umgewandelt und dann im Thermozykler amplifiziert wird, anschließend in einem ethidiumbromidhaltigen Gel elektrophoretisch aufgetrennt wird und

dann unter UV-Licht abgeleitet werden kann, wobei die Intensität der sichtbaren Banden im Vergleich Rückschlüsse auf die vorhandene Menge cDNA zulässt.

3.6.1. RNA-Extraktion aus den Zellen

RNeasy-Kit **Quiagen, Valencia, CA, USA**

Zunächst wurde mittels des RNeasy kits die RNA aus den Eosinophilen extrahiert: Man fügt dem Zellpellet 600 µl RLT-Puffer hinzu, belädt die RNshredder-Säule und zentrifugiert sie bei max. Geschwindigkeit (14.000 rpm, 2 min). Zu dem Eluat gibt man 600 µl 70%igen Ethanol. Damit belädt man die Rneasy mini spincolumns und zentrifugiert sie 15 sec bei 8000g. Anschließend fügt man 700 µl RW1-Puffer hinzu und zentrifugiert wiederum bei 8000g 15 sec, dann wiederholtes Auswaschen mit RPE-Puffer. Anschließend wurde die RNA mit Hilfe von 15µl Aqua dest. eluiert.

3.6.2 cDNA-Synthese

first-strand cDNA Sythesis Kit Boehringer, Indianapolis, IN, USA
Thermozykler MWG Biotech, Ebersberg, D

Die gewonnene RNA wurde anschließend mit Hilfe des 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR durch den Zusatz von Reverser Transkriptase und zyklisches Erhitzen und Abkühlen im Thermozykler in cDNA umgewandelt:

Master-Mix, für je 20µl:

- 2 µl 10x Reaction Buffer (100 mM Tris, 500 mM KCl, pH 8.3),
- 4 µl 25 mM MgCl₂,
- 2µl Deoxynucleotide Mix (je 10 mM dATP, dCTP, dTTP, dGTP),
- 2 µl Oligo-p(dT)15-Primer (0,8 µg/µl),
- 1µl RNase-Inhibitor (50 units / µl),
- 0,8 µl Reverse Transkriptase und
- 8,2 µl der gelösten RNA,

Inkubation im Thermozykler 10 min. bei 25°C , dann 60 min bei 42°C, 5 min erhitzen bei 99°C .

3.6.3 PCR

Amplifizierung der cDNA mittels PCR im Thermozykler:

Taq-Polymerase, Reaction Buffer	Person Elmer, Roche Inc., Branchburg, NJ, USA
Thermozykler	MWG Biotech, Ebersberg, D
Primer	MWG Biotech

Zunächst wird ein Probenansatz (25 µl) folgendermaßen hergestellt, dann Amplifikation der cDNA im Thermozykler nach untenstehendem Protokoll:

10x PCR-Puffer mit Mg (2,5µl)
 0,2 mM 10 mM dNTP-mixture (2 µl)
 je 0,5 µM des jeweiligen Primerpaares (0,125µl)
 2,5 units Taq-Polymerase (5 units/µl) (0,25 µl)
 Aqua dest. (19 µl)
 cDNA (1µl)

Positivkontrolle: cDNA von HMC-1-Zellen

Negativkontrolle: isolierte nicht amplifizierte RNA

verwendete Primer:

	5'-3' (Upstream)	3'-5' (Downstream)	Größe (bp)
NGF	TAA AAA GCG GCG ACT CCG TT	ATT CGC CCC TGT GGA AGA TG	167
BDNF	AGC CTC CTC TGC TCT TTC TGC TGG A	CTT TTG TCT ATG CCC CTGCAG CCT	296
GAPDH	GAT GAC ATC AAG AAG GTG GTG	GCT GTA GCC AAA TTC GTT GTC	197

Amplifikation:

10 Minuten bei 94°C

36-40 Zyklen

-1 Minute bei 94°C

-1 Minute bei 63-70°C mit Abnahme der Temperatur um 0,2-0,4°C/Zyklus

-1 Minute bei 72°C

10 Minuten bei 72°C

3.6.4 Gelelektrophorese:**TAE Puffer**

Tris Acetat Sigma, Deisenhofen, D

EDTA Merck, Darmstadt, D

Probenpuffer

50x TAE

Glycerin Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D

Bromphenolblau Merck

Agarose Amresco, Solon, Ohio, USA

Ethidiumbromid Sigma

100 bp Leiter Gibco BRL, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D

Anschließend wurde jede Probenreihe, mit Probenpuffer und mit Bromphenolblau als Laufmarker versetzt, zusammen mit einer 100bp-Leiter (1:10 verdünnt, 20 µl der Verdünnung), der Positivkontrolle und der Negativkontrolle in die Taschen eines 1,6%igen ethidiumbromidhaltigen Agarosegels (Agarose in 50 ml TAE-Puffer aufkochen und nach Abkühlen auf 50°C 5 µl Ethidiumbromid zur Anfärbung der DNA hinzugeben) einpipettiert, welches sich in einer mit TAE-Puffer (0,04 M Tris-Acetat, 0,001 M EDTA, pH 8.0) gefüllten Laufkammer befand. An diese Kammer wurde über 20-30 min. eine Spannung von 60 Volt angelegt, um eine Auftrennung der cDNA zu erreichen. Anschließend wurde das Gel im UV-Licht mittels einer Polaroidkamera fotografiert.

TAE-Puffer: (in 50facher Verdünnung zu verwenden)

242 g Trisbase

57,1 ml Eisessig

100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

Aqua dest. ad 1 l