

3. Materialien und Methoden

3.1 Gewinnung des Untersuchungsmaterials

Nach Genehmigung der Veterinärethikkommission der Universität Frankfurt wurde bei 23 weiblichen Kaninchen (New Zealand White Rabbits, mindestens 11 Monate alt, Gewicht 4,2 bis 5,3 kg, Züchter: Lammers, 53881 Euskirchen) am rechten Hinterbein das vordere Kreuzband durchtrennt und der mediale Meniscus entfernt. 11 Kaninchen erhielten über einen Zeitraum von 6 Monaten Futter, dem Harpagophytumextrakt (14% Harpagosid) 76 mg / 100 g mit 0,1 mg Harpagosid pro Gramm zugesetzt war. Tatsächlich nahmen die Kaninchen etwa das Doppelte der in der deutschen Monographie der Kommission E des ehemaligen Bundesgesundheitsamtes (Bundesanzeiger 1989, ergänzt 1990) empfohlenen Tagesdosis für Harpagophytum-Zubereitung auf. Nach 6 Monaten wurden die Kaninchen per Genickschlag anästhesiert und nach Eröffnen der Arteria jugularis entblutet. Der Hüftkopf wurde freipräpariert und der Knorpel abgeschält: zur RNA-Extraktion, zur Kryoeinbettung und zur Fixierung in Formalin.

3.1.1 Kryo-Einbettung

Aus dem rechten und linken Hüftkopf wurde Gewebe zur Kryo-Einbettung entnommen. Hierzu wurde eine Metall-Nierenschale mit dem Boden nach oben in eine Styroporkiste hineingelegt und die Kiste bis zum oberen Rand der Nierenschale mit flüssigem Stickstoff gefüllt. Das Bett wurde mit Medium (Jung, Darmstadt, Deutschland) gefüllt, das Gewebe in das Medium eingebracht und eventuell mit Medium nachtitriert, bis das Gewebe (ohne Lufteinschluß) völlig bedeckt war. Das Bett wurde auf den Boden der Nierenschale platziert bis es gefroren war, auf Trockeneis zwischengelagert und bei -80°C eingefroren.

3.1.2 Asservierung zur RNA-Extraktion

Knorpelgewebe beidseits aus rechtem und linkem Hüftkopf wurde für die Extraktion der RNA und späterer DNA-Produktion asserviert. Hierzu wurde der Knorpel in einen mit flüssigem Stickstoff gefüllten Mörser eingebracht und nach Schockgefrieren zerdrückt. Der zerdrückte Knorpel wurde mit flüssigem Stickstoff in ein 50 ml Falconröhrchen (Cellstar, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) überführt. Anschließend wurde das Zellgemisch mit 1,0 ml Trizol (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) aufgenommen und durch einen Quiaschredder filtriert, bei 13000 UpM zentrifugiert, auf Trockeneis zwischengelagert und bei minus 80 Grad aufbewahrt. Der Transport in die Klinik und Poliklinik für Innere Medizin / Universität Regensburg erfolgte auf Trockeneis.

3.2 Histologische Färbungen

3.2.1 Anfertigung von Kryogewebschnitten

Zum Anfertigen von Kryogewebschnitten wurde ein Jung Frigocut 2800E Kryostat (Leica, Nussloch, Deutschland) verwendet. Die Schichtdicke betrug 5µm bei einer Schneidetemperatur zwischen -20°C bis -28°C. Der Fixierungsvorgang wurde angepasst mit OCTm Tissue-Tek R (DiaTec, Hallstadt, Deutschland). Nach den Färbungen wurden die Schnitte mit dem Mikroskopsystem Leitz DM RBE, Software: Metaview (Leica, Heidelberg, Deutschland) fotografiert. Drei Untersucher zählten unabhängig voneinander die Zellkerne und beurteilten die Farbintensität des Zytoplasmas anhand einer Skala 0-2 (normal = 0, mittelstark = 1, stark = 2). Das Konsensergebnis zur Zellzahl und Farbintensität wurde statistisch berechnet (siehe Statistik, S. 52).

3.2.1.1 HE Färbung (Kernfärbung in Hämalaun)

Die Schnitte wurden luftgetrocknet. Anschließend wurden sie in eine Hämalaun-Lösung eingetaucht, geschwenkt zur Färbung der Zellkerne und danach mit Wasser 5 Minuten lang gespült. Nach kurzem Einbringen in eine 0,1%ige Eosin-Lösung zur Anfärbung des Zytoplasmas wurde wieder mit Wasser gespült. Danach wurden die Schnitte in eine aufsteigende Alkoholreihe (Beginn 70%) getaucht und zweimal mit Xylol fixiert und mit Entellan eingedeckt. Kerne und das Zytoplasma wurden mit Eosin rot angefärbt.

3.2.1.2 Elastica van Gieson Färbung

Es wurde der Färbekit nach Elastica van Gieson, Merck, Darmstadt, Deutschland verwendet. Die Schnitte wurden nach Lufttrocknung 10 Minuten mit einer Elastin-Lösung (nach Weigert) versetzt und anschließend 1 Minute unter fließendem Wasser gespült. Danach wurden die Schnitte 5 Minuten in eine Mischlösung (Weigert A zu Weigert B 1:1) eingebracht und anschließend eine Minute unter fließendem Wasser gespült. Nach Einbringen in eine Pikrofuchsinlösung für die Dauer von 2 Minuten wurden die Schnitte je eine Minute lang in eine aufsteigende Alkoholreihe (Beginn 70%) getaucht, dann mit Xylol fixiert und eingedeckt. Dadurch wurden die Kerne schwarz-braun, das Kollagen und Bindegewebe leuchtend rot und glatte und quergestreifte Muskulatur gelb gefärbt.

3.2.1.3 Safranin-O Färbung

Die Schnitte wurden nach kurzem Eintauchen in destilliertem Wasser 3 Minuten in eine Fast Green Lösung (5g Farbe pro 500 ml Aqua dest: Merck, Darmstadt, Deutschland) getaucht, bevor sie kurz in 3 % Essigsäure-Lösung eingebracht wurden. Anschließend wurden die Schnitte 5 Minuten in einer Safranin-O- Lösung (270 ml 3% Essigsäure + 30 ml Safranin-O: Merck, Darmstadt, Deutschland) geschwenkt und danach kurz mit destilliertem Wasser gespült. Nach Einbringen in eine aufsteigende Alkoholreihe (Beginn 70%) wurden die Schnitte mit Xylol fixiert und eingebettet. Zellkerne mit dichtem Chromatin, Chromosomen, Nucleoli und verholzte Zellwände wurden so rot angefärbt, das Cytoplasma, die Kernmembranen und die Cellulosewände grün.

3.3 Nachweis von Zytokinen

3.3.1 mRNA Isolierung mit Trizol

Die tiefgefrorenen Proben nach Quiaschredder-Behandlung wurden aufgetaut, mit 200µl Chloroform / Isoamylalkohol 24:1 versetzt und nach 3 Minuten vortexen 15 Minuten lang bei 11000 rpm (bei 4°C) zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig in ein neues Eppendorfhütchen überführt, um keine DNA- oder Proteine enthaltenden Bestandteile mitzunehmen. Im Anschluss wurden 500 µl Isopropanol hinzugegeben und mehrmals zur RNA Demaskierung invertiert, bevor die Mischung 30 Minuten im Kühlschrank inkubiert wurde. Nach 20 Minuten Kühlzentrifugation bei 12000 rpm wurde der Überstand bis auf das Pellet abgenommen, 1 ml Ethanol 100% zugegeben und resuspendiert. Nach weiterer Zentrifugation (5 Minuten bei 7500 rpm, 10°C) wurde der Überstand verworfen und der Rest in 1 ml Ethanol 75% resuspendiert, erneut 5 Minuten bei 7500 rpm (10°C) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet bei offenem Deckel im Heizblock bei 30°C getrocknet. Danach erfolgte die Resuspension in 45µl RNA Secure, die mit 15 µl DNase versetzt wurde (10 µl DNase + 70 µl RDD-Puffer). Die Mischung wurde kurz gevortext, dann abzentrifugiert und 30 Minuten bei 37°C und 20 Minuten bei 70°C inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der RNA Gehalt bestimmt und der Rest bei -80°C gelagert.

Zur exakten Konzentrationsbestimmung der RNA für die RT-PCR und die cDNA-Arrays wurde der RiboGreen tm RNA Quantification Kit (Molecular Probes, Leiden, NL) verwendet, bei dem sich der Fluoreszenzfarbstoff RiboGreen an die RNA bindet. Die Fluoreszenz wurde im Spectra Fluor Plus Fluorometer (Tecan, Crailsheim) bestimmt und die RNA Konzentration

anschließend mit Hilfe der Magellan Software ermittelt. Die Proben wurden entsprechend ihrer RNA Konzentration verdünnt, um einen Endkonzentrationsgehalt von 100 ng/µl zu erreichen.

3.3.2 Reverse Transkription zur Herstellung von cDNA

Zum Nachweis von RNA mittels PCR wurde an der einsträngigen RNA mittels einer retroviralen reversen Transkriptase (RT) eine zur RNA komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert. Diese cDNA diente bei der PCR als Matrize. Für diesen Prozess wurde der 1st Strand cDNA Synthesis Kit mit AMV reverse Transkriptase (Boehringer, Mannheim, Deutschland) und das RNase-free Dnase Set (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Der Reaktionsansatz zur cDNA-Synthese wurde in 0,2 ml PCR Reaktionsgefäßen auf Eis hergestellt:

Reagenzien	µl pro 20µl Ansatz
5 x RT Puffer	4
(500 mM Tris, 500mM KCl, 40 mM MgCl ₂ , pH 8,3)	
dNTP	2
Random Hexamers p(dN) ₆	0,25
AMV Reverse Transkriptase	2,6
Rnase Inhibitor (40 U/µl)	0,8
H ₂ O bidest	5,35
RNA	5

Die cDNA-Synthese erfolgte unter folgenden Bedingungen:

25°	10 Min	Binden der Oligonukleotide an die RNA
42°	60 Min	Überschreiben der RNA in cDNA
99°	5 Min	Inaktivierung der Reversen Transkriptase
4°	∞	Beendigung der Reaktion

3.3.3 Design der genspezifischen Oligonukleotide

Da die Gensequenzen des Kaninchengenoms nur zum Teil bekannt sind, wurden aus den matrixum- und abbauenden Molekülen die Gene ausgesucht aus denen sich kompatible

Gensequenzen erstellen liessen. Die genspezifischen Oligonukleotide wurden mit dem Programm „DNAsis 2.5“ (Hitachi Software Engineering Co.) entworfen, mittels BLAST Search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) auf ihre Spezifität hin geprüft (Altschul et al 1997) und von der Firma MWG Biotech, Ebersberg in HPSF-Qualität (high purity salt free) bezogen. Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden in destilliertem Wasser gelöst (100 pmol/µl). Beim Entwurf der genspezifischen Oligonukleotide wurden folgende Parameter beachtet: Die Oligonukleotidlänge sollte 20 bzw. 21 Bp betragen, da der gaschromatographisch ermittelte Gehalt (GC) der Oligonukleotide Auswirkungen auf die Schmelztemperatur des Oligonukleotids und somit auf die Primerbindungstemperatur hat. Der optimale GC-Gehalt soll 45 bis 55% betragen. Da die veröffentlichte cDNA Bibliothek für Kaninchen nur eine begrenzte Anzahl kompletter Gene enthält, musste ein GC Gehalt bis 70% akzeptiert werden. Der GC-Gehalt der „forward“ and „reverse“ Oligonukleotide musste aber gleich sein. Von den in Tabelle 12 zusammengefassten erstellten und im Blastprogramm geprüften Primern wurden folgende mittels PCR getestet:

Tabelle 12

Design der genspezifischen Oligonukleotide nach Überprüfung mit Blast

Primer	Sequenz(5'-3')
gapDH-forward	ATCACTGCCACCCAGAAGAC
gapDH-reverse	GTGAGTTTCCCGTTCAGGTC
IL-8rec-forward	GTCGTCATCTATGCCCTGGT
IL-8rec-reverse	GCCAGGTTCAGCAGGTAGAC
IL-6-forward	CTTCAGGCCAAGTTCAGGAG
IL6-reverse	GGGTGGCTTCTTCATTCAA
18Shuman-forward	GTCTGTGATCGGGTTAGATG
18Shuman-reverse	AGCTTATGACCCGCACTTAC
18Srabbit-forward	CGCGGTTCTATTTTGTTGGT
18Srabbit-reverse	GGTCGGGTCATGGGAATAAC
MMP13-forward	TCCCTTGATGCCATTACCAG
MMP13-reverse	TAGCCATTAGGAGCCCAAAA
MMP13-forward*	CCCTTGATGCCATTACCAGT
MMP13-reverse*	GGCCAAAAGGACTTCGTAA
TIMP-2-forward	ACGGCAACCCCATCAAGAGGA

TIMP-2-reverse	GGAGTCCCAGGGCACGATGAA
Aggrecan-forward	GCCTGTGGTGTGCGGTGGTG
Aggrecan-reverse	GGACCCCAGGACCCCAGTT
Osteonectin-forward	ACCCCATGTGCGTGTGCCA
Osteonectin-reverse	ACGCAGTGGGGCCAGCTCAG
Biglykan-forward	GCGCATCTCAGAAGCCAAGC
Biglykan-reverse	CCGTTGTAGTAGGCCCGCTTC

3.3.4 Durchführung der PCR zum Zytokinnachweis

Thermocycler-Verfahren

Es wurde die PCR-Methode nach Saiki (Saiki et al 1985; Saiki et al 1988) gewählt (Gesamtvolumen 20 µl). Als Matrize diente die gewonnene cDNA (siehe oben), zu der je 10 pmol der entsprechenden Oligonukleotid-Primerlösung und 10 µl des Mastermixes aus dem Taq PCR Master Mix Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) sowie nukleinsäurefreies destilliertes Wasser hinzugefügt wurden (Gesamtvolumen 20µl):

Reagenzien	µl pro 20µl Ansatz
Supermix	10
Primer	1
dH2O	7
cDNA	2

Die Amplifizierung erfolgte standardmäßig in einem Thermocycler nach folgendem Programm:

5 Min	94° C		Denaturierung		
35x	94° C	30s	Denaturierung		
	...° C	30s	Primerbindung	(°C:	individuelle
Annealingstemperatur)					
	72° C	60s	Primerverlängerung		
7 Min	72° C		Primerverlängerung		

Dabei war der Annealingtemperatursturz (schnelles Herabkühlen auf eine Temperatur um 50°C) vom jeweils eingesetzten Oligonukleotid-Primerpaar abhängig und wurde individuell

festgelegt, damit sich der komplementäre Primer an die passende Stelle der DNA anlagern (annealen) konnte. Der ca. 20 Basenpaare große Primer lagerte sich im Allgemeinen sehr schnell an die entsprechende Stelle an, so dass in späteren Zyklen bereits angereicherte DNA (die wesentlich größer ist) keine Möglichkeit fand, den Primer zu verdrängen. Bei der anschließenden Polymerisation wurde die Temperatur auf 72°C erhöht, um die thermostabile Polymerase in den Bereich des Temperaturoptimums zu bringen. Dadurch wurde der an der DNA haftende Primer verlängert, indem Desoxynukleotide komplementär zum Template eingebaut wurden. Die Polymerisation endete mit der Komplettierung der DNA. Durch erneutes Aufkochen auf 96°C (Denaturierung) wurde die entstandene DNA-Doppelhelix wieder in zwei Einzelstränge getrennt, von denen der eine wieder als Vorlage für eine erneute Polymerisationsrunde zur Verfügung stand (Abb. 10). Im Einzelfall umfassten die Polymerase-Kettenreaktionen 20 - 50 Zyklen, je nach verwendeter Polymerase, Temperatur oder Template-Länge. Um Mediatoren nachweisen zu können, wurden die PCR-Produkte durch Agarose-Gelelektrophorese anhand ihrer Größe identifiziert. Das Laufgel wurde wie folgt hergestellt: 0,3g Seaham LE Agarose (Biozym) wurde mit 30 ml TAE Puffer (Tris 40mM, Essig 20mM) vermischt und in der Mikrowelle kurz aufgekocht. Beim Abkühlen wurde Gelstar „nucleid acid gel stain“ (BMA Bio Whittaker Molekular Application) zugegeben und nach dem Erkalten 20µl der cDNA-Loading Buffer-Mischung (je 20µl) auf das Gel appliziert. Die erste Säule diente der Kontrolle mit 2µl 100 bp ladder (Standard) (Agarose-Gelelektrophorese, Gibco, Karlsruhe). Durch das angelegte Spannungsfeld wanderten die kürzeren DNA-Stränge schneller zum Pluspol als die längeren. Zur Identifizierung der Zytokine wurden die Basenpaarlängen der PCR-Produkte mit dem Standard (bp-ladder) verglichen.

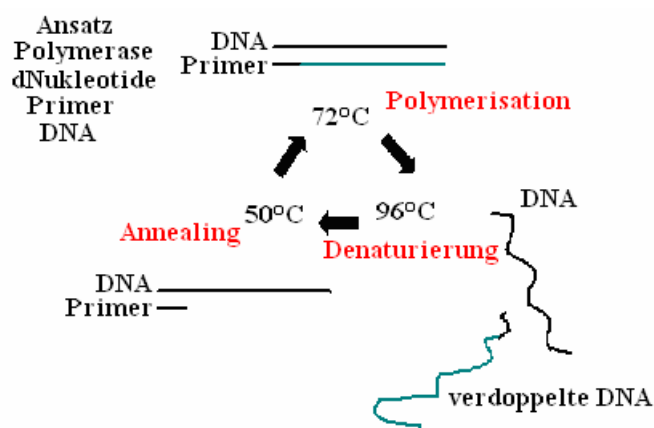


Abbildung 10

Vereinfachtes Schema eines PCR-Ablaufs

Lightcycler-Verfahren

Der LightCycler® (GeneAmp R PCR System 9700, PE Applied Biosystems, Roche Diagnostics, Weiterstadt) ist ein extrem schneller Thermocycler mit der Möglichkeit der Echtzeit- (Real-Time) Fluoreszenz-Detektion. Dadurch ist es möglich, die Amplifikation einer Nukleinsäure während des Laufes zu beobachten. Das ermöglicht die Quantifizierung der Ausgangsmenge, das heißt die Quantifizierung von mRNA (cDNA) und DNA, sowie die Typisierung von Proben mittels einer Schmelzpunktanalyse. Der LightCycler® arbeitet mit hohen Heiz- und Kühlraten. Innerhalb von nur 20 Minuten können 30 Zyklen durchgeführt werden. Der LightCycler® weist die Fluoreszenz in drei getrennten Kanälen nach. Die Quantifizierung des zunehmenden PCR Produkts erfolgt durch Fluoreszenzmessungen DNA bindender Fluorophore, TaqMan oder Hybridisierungs sonden, da während der Elongationsphase immer mehr Farbstoffmoleküle an die neusynthetisierte DNA binden können. Der Lightcycler misst am Ende eines jeden Elongationsschnittes die Gesamtfluoreszenz in der Kapillare (530nm, Kanal 1) und somit die Zunahme an PCR-Produkten. Da die Fluoreszenz unabhängig von der Sequenz der DNA ist, muss nach jedem Lauf eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden, um das Vorhandensein von Primerdimeren und unspezifischen Produkten ausschließen zu können. Da der Schmelzpunkt, bei dem sich die beiden DNA-Einzelstränge voneinander trennen, für jedes PCR-Produkt spezifisch ist und von dessen Länge und GC-Gehalt abhängt, nimmt die Fluoreszenz zu diesem Zeitpunkt stark ab (da SYBR-Green sich nur an doppelsträngige DNA bindet). Zeigt eine Schmelzkurve zwei oder mehrere solcher Punkte, ist vom Vorhandensein unspezifischer Produkte auszugehen, wodurch die Quantifizierung unmöglich wird. Zur relativen Quantifizierung wurde 18S-rRNA als interner Standard verwendet, wobei die Reaktionen für das zu untersuchende Gen und die 18S-rRNA parallel in einem Lauf angesetzt wurden. So konnte durch die Real-Time Detektion das Amplicon direkt quantifiziert werden. Durch die Vermeidung einer Post-PCR-Manipulation war dazuhin die Kontamination mit anderen PCR Produkten nahezu ausgeschlossen.

Zur relativen Quantifizierung müssen die verwendeten Oligonukleid-Paare an die der 18S-rRNA (internen Standard) angepasst werden. Die ideale Primerbindungstemperatur sollte möglichst nahe an der des internen Standard-Primerpaares liegen, da dies die idealen PCR-Bedingungen zur Bildung beider Fragmente gewährleistet. Unter idealen PCR-Bedingungen findet eine Produktverdopplung pro Zyklus statt, entsprechend einer optimalen Effizienz von 2. Zunächst sollten die Effizienzen der in Relation gesetzten Gene möglichst nahe beieinander liegen, um Fehler zu vermeiden (bei ungleicher Amplifikationseffizienz besteht die Gefahr, bei der relativen Quantifizierung falsche relative Expressionsunterschiede zu

erhalten). Dies kann nur durch die Wahl des geeigneten Oligonukleotids vermieden werden (Tabelle 13).

Tabelle 13

Beispiel für effizienzen- und zyklenzahlabhängige Expressionsunterschiede (n=30):

N= Anzahl Zyklen; N=Anzahl amplifizierter Moleküle; No= Anzahl Ausgangsmoleküle

E=1,95	$N = N_0 \times 1,95^{30} = N_0 \times 5,0 \times 10^8$	⇒ 2,2facher Unterschied
E=1,90	$N = N_0 \times 1,90^{30} = N_0 \times 2,3 \times 10^8$	

Außerdem muss für die LightCycler-Analyse eine MgCl₂-Testung vorgenommen werden, um die ideale MgCl₂-Konzentration für die jeweiligen Primerpaare zu ermitteln. Vor jeder relativen Quantifizierung muss daher eine Optimierung der PCR durchgeführt werden. Dies erfolgt anhand von Verdünnungen (1:10, 1:100, 1:1000 oder 1:2, 1:4, 1:8) derselben Matrize mit verschiedenen MgCl₂-Konzentrationen (Standardmethode nach Roche / Mannheim), wobei die Verdünnungen als Standards definiert werden. Die Steigung (slope) der Standardkurven (lg der Konzentration vs ct-Wert) und die Effizienz werden mittels einer Software nach folgender Formel errechnet: $E = 10^{-1/slope}$. Die Effizienz sollte $2 \pm 0,05$ betragen und die Effizienzen der zu vergleichenden Produkte (spezifisches Gen / internem Standard) sollten nicht sehr davon abweichen.

Mittels der LightCycler Software konnte der ct-Wert jeder Reaktion bestimmt werden (der ct-Wert gibt den Zyklus an, bei dem alle analysierten Proben die gleiche Produktmenge aufweisen). Hierzu wurde die „Second Derivative Maximum“ Methode verwendet. Die ct-Werte der genspezifischen Reaktion wurden auf den ct-Wert der jeweils parallel durchgeführten Reaktion mit dem 18S -rRNA Primer normalisiert. Hierzu wurden die ct-Werte voneinander subtrahiert. Die Berechnung und graphische Darstellung wurde mit Microsoft Excel durchgeführt.

$$\Delta ct = ct(\text{Gen}) - ct(\text{18S})$$

3.3.4 Phosphatase-Peroxidase Immunhistochemie (AEC Substrat-Kit)

Zur Bestätigung von TIMP-2 auf Proteinebene wurde die Biotin-Streptavidin-Amplified-Methode (BSA) angewandt (Abb. 11). Als Kontrolle wurden VEGF und MMP13 verwendet. Nach Freilegung der antigenen Determinanten der nachzuweisenden Mediatoren erfolgte

zuerst die Bindung eines Primärantikörpers an den Mediator. Der Nachweis dieses Antikörpers wird mit einem weiteren, gegen den Primärantikörper gerichteten biotinylierten Antikörper durchgeführt. An das Biotin bindet sich Streptavidin, das vier hochaffine Bindungsstellen für Biotin besitzt (Dissoziationskonstante = 10^{-15} M) und mit einem Enzym konjugiert ist. Durch dieses Enzym wird abschließend ein farbloses, wasserlösliches Chromogen und Substrat in einen wasserunlöslichen Farbstoff umgesetzt.

Die Schnitte wurden 5 bis 10 Minuten lang in kalter Aceton-Lösung fixiert (-20°C) und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet. Die Schnitte wurden dann mit einer die endogene Peroxidase hemmenden Lösung (0,3% H_2O_2 in Tris/NaCl pH 7,6 (6g/l Tris, 8g/l NaCl; 0,5ml einer 30%igen Wasserstoffperoxidlösung in 50ml Tris pH 7,6)) versetzt, um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren. Danach wurden die Schnitte in Tris pH 7,6 gewaschen. Um weitere unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Schnitte in 2% igem Normalserum, das Fishgelatin/Glycin-Lösung enthielt (20 μl Normalserum + 980 μl Fishgelatin/Glycin-Lösung), für die Dauer von 30-45 Minuten bei Raumtemperatur belassen.

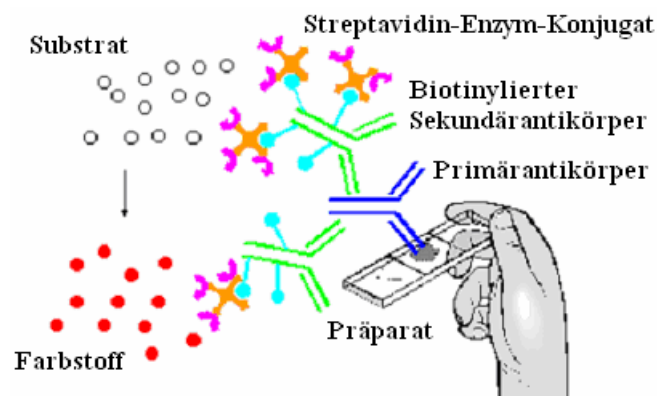


Abbildung 11

Schematische Darstellung der BSA-Methode

Zur Herstellung der Fishgelatin/Glycin-Lösung wurde 350 mg Glycin in 50ml Tris pH 7,6 gelöst, 6 ml davon verworfen und 1 ml Gelatine von „cold Water Fish Skin“ (Sigma, 250 ml) zugeben.

Das Normalserum, das verwendet wird, richtet sich nach der Spezies, in der der Sekundärantikörper produziert wird. In diesem Fall bei Verwendung eines biotinylierten goat anti mouse Antikörpers als Sekundärantikörper muss mit „normal goat serum“ (Jackson Immunoresearch, Dianova, Hamburg, Deutschland) geblockt werden. Dazu wurde je Schnitt 100 μl appliziert.

Als Primärantikörper wurden TIMP-2, VEGF und MMP-13 verwendet. Hierzu wurden 100 µl pro Schnitt appliziert. Die Inkubationszeit der Schnitte betrug:

- a) eine Stunde bei Raumtemperatur
- b) etwa 14 Stunden bei 4°C
- c) etwa 14 Stunden bei 4°C mit anschließender Silberfärbung

bei drei Konzentrationen (1:25, 1:50 und 1:100) der Serum-Fish Skin /Glycin-Lösung.

Als Negativkontrolle wurde ein primär antikörperfreier Schnitt mitgeführt.

Danach wurden die Schnitte mit Tris pH 7,6 Lösung 3-mal gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit 100 µl biotinyliertem sekundären Antikörper in Tris/NaCl Lösung pH 7,6 für die Dauer von 45 Minuten bei Raumtemperatur. Da der Primärantikörper ein mouse anti human Antikörper war, muss der Sekundärantikörper ein Biotin goat-anti-mouse-Antikörper sein („Biotinyliertes goat anti mouse Ig specific polyclonal antibody“, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA). Nach dreimaligem Waschen mit Tris-Lösung pH 7,6 wurden die Schnitte inklusive der Negativkontrolle mit 100 µl Meerrettichperoxidase-konjugiertem Streptavidin-HRP (Jackson Immunoresearch, Dianova, Hamburg, Deutschland, verdünnt in 1:600 Tris pH 7,6) während 45 Minuten inkubiert. Die Signaldetektion erfolgte unter Verwendung des AEC Substrat-Kits (Vector Laboratories, Burlingame, USA) nach Angaben des Herstellers. Das Substrat wurde für 30 Minuten auf die Schnitte aufgebracht, eine Farbreaktion konnte nach 1-30 Minuten nachgewiesen werden. Die Färbung wurde durch Waschen mit Tris/NaCl-Lösung pH 7,6 gestoppt und wässrig eingedeckelt.

3.3.5 Immunogold-Silberreaktion

Für die Silberfärbung wurden die Schnitte abschließend für 60 Minuten mit 100 µl anti-Meerrettichperoxidase-Antikörper, an die 6nm große Goldpartikel gebunden waren (Anti-HRP goldmarkiert, Jackson Immunoresearch, Dianova, 6nm colloidal Gold-affinepure Anti-HRP [EM-Grade]) inkubiert (Verdünnung mit Tris/NaCl-Lösung 1:30, pH 7,6) nachdem das Meerrettichperoxidase-konjugiertem Streptavidin-HRP Fish Skin mit Glycin-Lösung 1:600 verdünnt wurde. Die Signalentwicklung erfolgte photochemisch in der sog. Immunogold-Silberreaktion, die in einer Modifikation des ursprünglichen Protokolls von Komminoth et al (1992) durchgeführt wurde. Hierfür wurden die Gewebeschnitte zunächst in Tris/NaCl pH 7,6 gewaschen und danach mit 3%igem Glutardehyd-Cacodylat (3% Glutaraldehyd-Cacodylat: 37,5% (v/v) Glutaraldehyd (8%) + 50% (v/v) Cacodylatpuffer (0,2 M Cacodylat, pH 7,35)) für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Zur photochemischen Silberverstärkungsreaktion wurde zunächst exakt 5 Minuten mit der Entwicklungslösung Hydrochinon (Fluka, Sigma-

Aldrich, Hannover, Deutschland 100g, 2,5 mg/ml in destilliertem Wasser 1:1), anschließend mit der Entwicklungslösung Hydrochinon/Silberacetat (2 mg/ml Hydrochinon und 2 mg/ml Silberacetat (Fluka, 50 mg) in destilliertem Wasser) zwischen 15 und 20 Minuten inkubiert. Die Schnitte wurden nochmals mit photographischem Fixiermedium (10% Agefix, Agfa, Leverkusen) für 2 Minuten fixiert und anschließend intensiv mit destilliertem Wasser gewaschen. Nun wurden direkt die Deckgläschen zur Beurteilung der Färbung aufgebracht.

3.4 Zellkulturen

3.4.1 Dreidimensionale bovine Alginatchondrozytenkultur

Ein zweifach verschieden gereinigter Harpagophytum-Extrakt wurde zusammen mit einem Weidenextrakt in einem dreidimensionalen Modell untersucht. Die tierischen und humanen Knorpelzellen wurden in gleichmäßige Alginatkügelchen suspendiert und jeder Extrakt wurde in diese Suspension pipettiert. Das erste Knorpelzellmaterial stammte vom Rind. Der Knorpel wurde aus frischen Rinderbeinen durch sterile Eröffnung des Kniegelenks entnommen und mit Hilfe von den Enzymen Hyaluronidase, Pronase und Kollagenase verdaut. Nach Abschluss der Verdauung wurde mit Tryptanblau die Anzahl der Zellen gezählt um eine gleichmäßige Zellverteilung in den Alginatkügelchen zu erreichen. Die Extrakte wurden mit PBS verdünnt und mit DMEM-Nährlösung (10mM HEPES, 1% sol AB P/S, 1% ITS+, 50µg / ml Vit C, 2mM Prolin, 200µg / ml Glutamin) nach einer Washout Phase in DMEM vermengt, so dass folgende Konzentrationen für die 3 Extrakte vorlagen: 100µg, 33µg, 10µg, 3,3µg und 1µg. Alle 3 Tage wurde die Nährlösung getauscht und mit der alten Suspension wurde eine LDH (Lactatdehydrogenase), NO₂ und NO₃ Messung unternommen. Dies wurde im kontinuierlichen Abstand von 3 Tagen unternommen, in einer Gesamtkulturzeit von 12 Tagen.

3.4.2 S35 Chondrozytenzellkultur und Suspensionskultur

Eine S35 Kultur (36 Stunden) mit Ziel der Prostaglandinkonzentrationsbestimmung wurde mit Rinderknorpelzellen durchgeführt, welche mit destilliertem Wasser aufgelöst wurden nach Ablauf des Verdauungsvorgangs und Stimulation mit und ohne LPS. Die Extraktkonzentration in diesem Versuch war: 100µg/ml, 33µg/ml und 1µg/ml. Für den Dialysevorgang wurde folgende wässrige Lösung verwendet: 72,6g Tris-HCL, 157,2g EACA (Acide diamino caproique), 44,64g EDTA, 6000mg NaN₃, 10440mg Benzamidine und 12mg

Trypsin soybean inhibitor. Im Anschluss an den Dialysevorgang wurde ein DNA-Test durchgeführt, indem die DNA mit PBS vermengt wurde und mit Ultraschall aufgelöst wurde. Daraufhin wurde der Versuch in einer Suspension über den Zeitraum von 3 Tagen mit S35 wiederholt. In einer weiteren Suspensionslösungsreihe über den Zeitraum von 3 Tagen mit und ohne LPS stimulierter boviner Zellen wurde der PGE2 Gehalt im Vergleich zu der vorhandenen DNA gemessen (Konzentration der Extrakte 100, 33, 1).

In einer Suspensionslösungsreihe über den Zeitraum von 3 Tagen wurden humane Knorpelzellen mit IL 1 beta im Vergleich zu einer Kontrollgruppe stimuliert. Aus dieser Versuchsreihe wurden die PGE2, NO₂ und NO₃ Konzentration gemessen.

3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Berechnung wurde von Prof. Dr. Thomas Torda, University of New South Wales, Sydney, Australien durchgeführt. Zur statistischen Auswertung wurde die Software „Social Sciences package (SPSS Inc. Chicago, ILL)“ genutzt. Alle Variablen wurden hinsichtlich ihrer Normalverteilung unter Verwendung des Kolmogorov-Smirnof Tests geprüft. Bei Normalverteilung der kontinuierlichen Daten wurde der T-test für gepaarte bzw. ungepaarte Variablen genutzt, bei nicht normaler Verteilung der Wilcoxon Rank Sum Test für gepaarte Daten und der Mann-Whitney-Test für ungepaarte Daten. Als signifikant wurde $p < 0,05$ definiert.

MW	Mittelwert
SD	Standardabweichung
SEM	Streuung der Differenz
CI	Konfidenzintervall
N	Anzahl der Tiere
df	Freiheitsgrad
Sig	Signifikanz
t-Wert	Transformation des Stichprobenkennwertes

$$t = \frac{(m_t - m_n)}{\text{SEM} * (m_t - m_n)}$$

m_t Mittelwert der Stichprobe t

m_n Mittelwert der Stichprobe n

M Populations-Mittelwert

SEM *geschätzter Standardfehler

