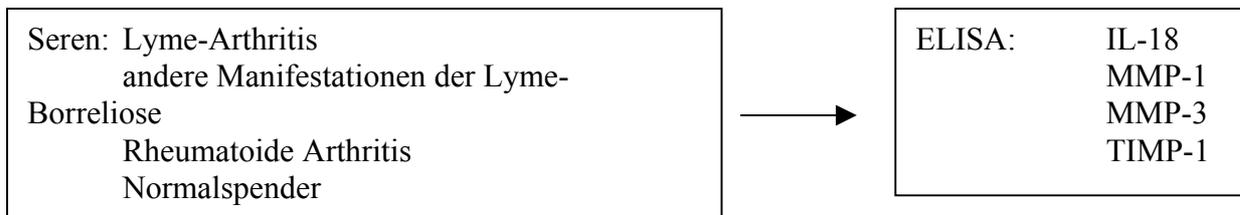


3 MATERIAL UND METHODEN

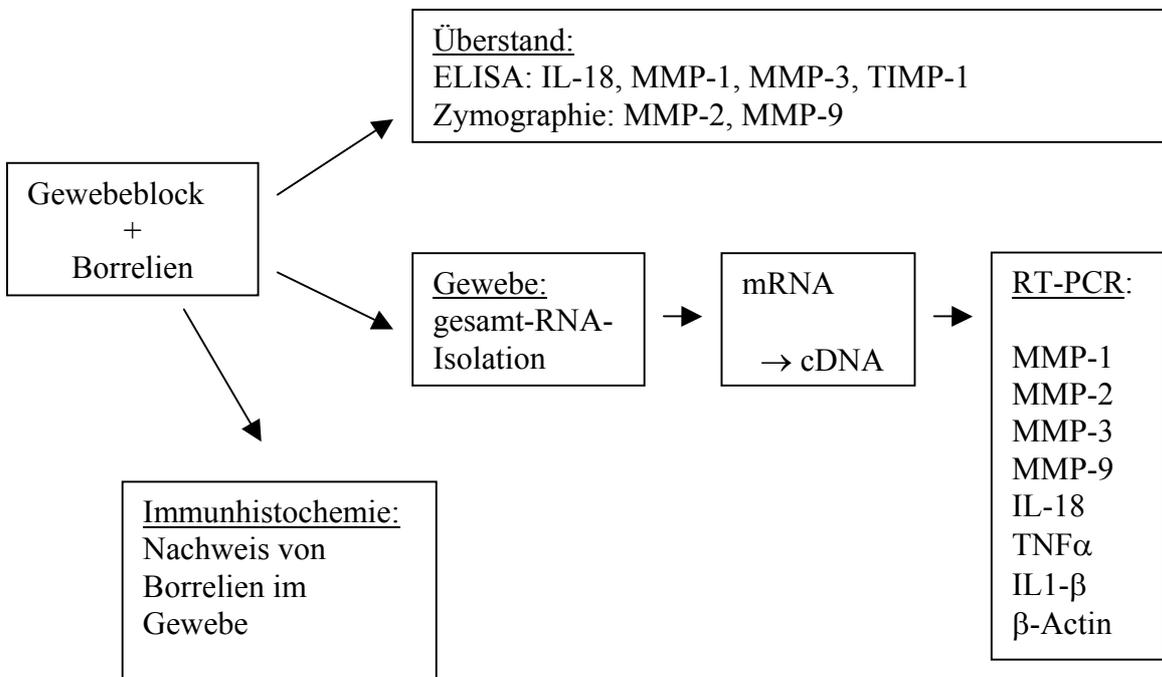
Der experimentelle Teil der Arbeit wurde in den Labors der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie der Charité durchgeführt. Die Zymographie erfolgte in Kooperation mit der Forschungsabteilung der Klinik für Urologie der Charité.

3.1 Schematische Übersicht über den Arbeitsplan

in vivo:



in vitro:



3.2 Zell- und Borrelienkultur

Die Arbeiten mit vitalen Geweben und Borrelien erfolgten an einer Laminar Air Flow Box, um Kontaminationsgefahren möglichst gering zu halten.

3.2.1 Kulturmedien

Borrelienspezifisches Medium

Die Anzucht der Borrelien erfolgte in BSK-H-Medium (Barbour-Stoenner-Kelly Medium), welches mit 6 % Kaninchen-Serum und 2 mM L-Glutamin supplementiert wurde. Das Kaninchen-Serum wurde dafür mit einem 0,2µm Filter sterilfiltriert.

Zellmedium

Als Grundlage wurde RPMI-1640-Medium (Rosewell Memorial Institute Medium) verwendet, welches 25 mM HEPES, 2 g/l NaHCO₃, 5,5 g/l NaCl und 2 mM stabiles L-Glutamin enthielt. Dieses wurde mit 10 % fetalem Kälberserum angereichert, welches vorher für 30 Minuten bei 56°C inaktiviert wurde. Um einer Kontamination mit gram-positiven Bakterien vorzubeugen, wurde dem Medium 100 U/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin zugefügt.

Co-Kulturmedium

Zur gemeinsamen Anzucht von Borrelien und Synoviozyten wurden zwei Volumeneinheiten BSK-H-Medium mit einer Volumeneinheit RPMI-1640-Medium gemischt: 400 ml BSK-H wurden mit 4 ml einer 200 mM L-Glutaminlösung angesetzt (Endkonzentration: 2 mM), 200 ml RPMI-1640 zugegeben und mit 6 % sterilfiltriertem Kaninchenserum supplementiert (ohne Antibiotika) (Franz et al. 2001).

Die Medien wurden jeweils vorsichtig gemischt und anschließend bei Kühlschranktemperatur aufbewahrt. Von jedem Ansatz wurden Sterilkontrollen durchgeführt, indem 5 ml in einem Falconröhrchen bei 37°C inkubiert und auf Verkeimung mikroskopisch untersucht wurden.

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Materialien

Barbour-Stoenner-Kelly Medium (BSK-H-Medium), Cell Concepts, Umkirch, Deutschland
Rabbit-Serum, Biochrom, Berlin, Deutschland
L-Glutamin 200 mM, Biochrom, Berlin, Deutschland
Rosewell Memorial Institute Medium, Biochrom, Berlin, Deutschland
Fetal bovine serum, Biochrom, Berlin, Deutschland
Penicillin (100 U/ml)+Streptomycin (100 µg/ml), Biochrom, Berlin, Deutschland
Zell-Filter (steril), 0,2 µm, Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Falconröhrchen, 50 ml / 15 ml, Nunc, Naperville, USA

3.2.2 Kulturelle Anzucht der Borrelienstämme

Die Borrelien wurden in 15 ml-Falconröhrchen bei 37 °C unter mikroaerophilen Bedingungen angezüchtet.

Die mit 20 % Glycerin und 20 % Kaninchenserum eingefrorenen Borrelien (flüssiger Stickstoff) wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und 1:10 mit Borrelien-spezifischem Medium (supplementiertem BSK-H-Medium, s. 3.2.1) versetzt. Die Inkubation erfolgte bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase. Die Stämme wurden alle 2–3 Tage im Dunkelfeldmikroskop auf Menge, Vitalität und Verkeimung überprüft. Bei gutem Wachstum (Farbumschlag nach gelb = sauer durch Laktatbildung) wurden 90 % der Suspension verworfen und der restliche Teil mit derselben Menge an frischem Medium aufgefüllt (1:10-Verdünnung).

In den Versuchen wurden die in Tabelle 2 aufgelistete Borrelienstämme verwendet.

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Borrelienstämme

humanpathogene Arten:		
<u>Genospecies</u>	<u>Stamm</u>	<u>Herkunft</u>
<i>B. burgdorferi sensu stricto</i>	B 31	DRFZ, Berlin
	N 40	
	ZS 7	M.M. Simon, MPI Freiburg
<i>B. garinii</i>	PBI	DRFZ, Berlin
<i>B. afzelii</i>	PKo	Pettenkoferinstitut, München

apathogene Arten:	
<i>B. japonica</i>	Pettenkoferinstitut, München
<i>B. valaisiana</i>	Pettenkoferinstitut, München

3.3 Versuchsansätze der dreidimensionalen Gewebekulturmodelle

3.3.1 Präparation von Gewebe

Die Gewebeexplantate stammten von Patienten mit Rheumatoider Arthritis oder Osteoarthritis, bei denen eine Synovektomie oder Gelenkersatzoperation durchgeführt wurde. Die Explantate wurde freundlicherweise von der Orthopädischen Klinik der Charité (Prof. Neidel) zur Verfügung gestellt. Die Patienten wurden vor dem Eingriff um ihre Zustimmung gebeten, die Gewebe für die geplanten Untersuchungen verwenden zu dürfen.

Das Synovialgewebe wurde in physiologischer Kochsalzlösung unter Kühlung transportiert und sofort weiterverarbeitet. Unter sterilen Bedingungen erfolgte zunächst eine Spülung mit PBS (PBS Dulbecco ohne Ca/Mg, Biochrom, Berlin, Deutschland), dann wurden die derb-fibrotischen und fettreichen Anteile mit einem Skalpell abgetrennt und die zellreichen zottenartigen Gewebeteile in Stücke mit 3–5 mm Kantenlänge geschnitten. Um einen Überblick über die Qualität des gewonnenen Gewebes zu bekommen, wurde ein Block wie unter 3.3.3. beschrieben in flüssigem Stickstoff eingefroren und ein Kryoschnitt gemacht. So konnte das Gewebe nach einer Hämatoxylin-Färbung im Lichtmikroskop begutachtet werden. Die anderen Gewebestücke wurden in 6-Well-Platten (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) für ein bis zwei Tage in mit fetalem Kälberserum und Penicillin-Streptomycin angereichertem RPMI-1640-Medium (pro Well 3 ml) bei 37 °C inkubiert, bevor sie nach zwei Tagen in antibiotikafreiem Co-Kulturmedium mit Borrelien infiziert werden konnten.

3.3.2 Infektion der Gewebeeplantate mit *Borrelia burgdorferi*

Nachdem die Borrelien lichtmikroskopisch auf Vitalität geprüft worden waren und eine Verkeimung ausgeschlossen werden konnte, wurde die Anzahl der Borrelien mittels Densitometriemessung (Shimadzu Spektrophotometer UV-160A) ermittelt. Dafür wurde 1 ml der Borreliensuspension mit 100 µl einer 1M HCl-Lösung versetzt und bei 650 nm im Vergleich zum Referenzwert (1 ml unverbrauchtes Medium + 100 µl HCl) die optische Dichte bestimmt (Fritze 1999). Anschließend wurden die Borrelien bei 4000 U/min für 20 Minuten abzenrifugiert, der Überstand verworfen und die unten abgesetzten Borrelien in 2 ml Co-Kulturmedium resuspendiert. Nach erneuter Bestimmung der optischen Dichte konnte eine entsprechende Menge an Co-Kulturmedium hinzugegeben und die Konzentration damit auf 10–15 Mio Borrelien/ml eingestellt werden. Die bereits in Co-Kulturmedium liegenden Gewebelöcke konnten nun mit der Borreliensuspension infiziert werden, und zwar mit 3 ml Bakteriensuspension pro Kultur (jeweils in einem Well). Jede Gewebekultur war folglich mit 30–45 Mio Borrelien infiziert. Zu je 2 infizierten Geweben (eins für die anschließende RNA-Extraktion, eins für die IHC, s. auch Abb.1) wurde eine Nullkontrolle angesetzt, also ein makroskopisch ähnlicher Gewebelöck mit 3 ml reinem Co-Kulturmedium versetzt. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurde der Überstand lichtmikroskopisch auf Verkeimung und Vitalität der Borrelien überprüft sowie 2/3 des Überstands abgenommen und bei –20 °C (für den ELISA) bzw. –80 °C (für die Zymographie) eingefroren. Der Ansatz wurde mit 2 ml frischem Co-Kulturmedium aufgefüllt, so dass die Bakterienkonzentration bei einer durchschnittlich angenommenen Generationszeit von 16 Stunden (Fritze 1999) konstant gehalten wurde.

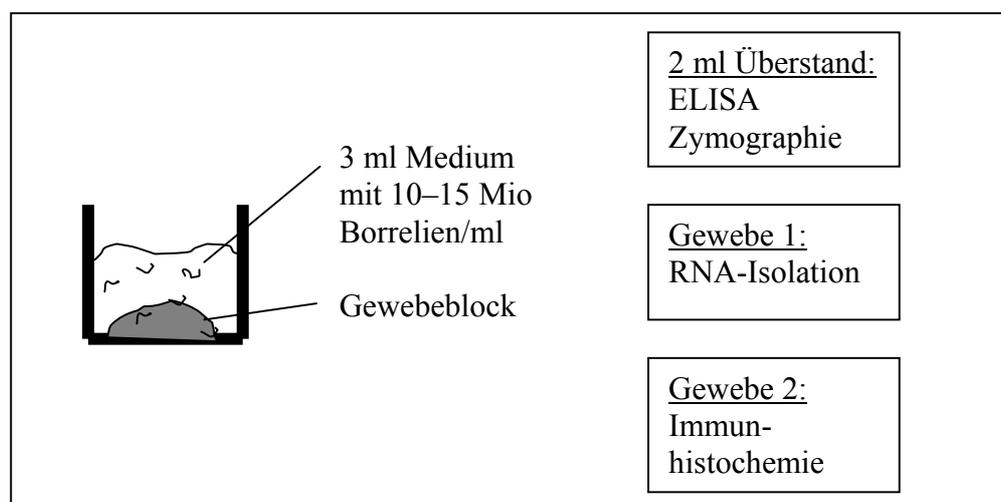


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Versuchsansatzes

3.3.3 Einfrieren der Gewebeexplantate und Anfertigung von Kryoschnitten

Gewebe, die der RNA-Isolierung (s. 3.7.1) dienen sollten, wurden in ein 1,8 ml Kryoröhrchen überführt; für die immunhistochemische Untersuchung der Synovialgewebe wurden die Proben in Tissue-Tek Kryogefäße gelegt und in Tissue-Tek Kryomedium eingebettet. Nach langsamem Einfrieren in flüssigem Stickstoff wurden die Proben bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Herstellung der Kryoschnitte erfolgte am Kryostaten. Die Schnittdicke wurde auf $5\mu\text{m}$ eingestellt und die Schnitte auf Silan-beschichteten Objektträgern getrocknet (2–3 Schnitte pro Objektträger). Zur orientierenden Färbung wurde pro Probe eine Hämatoxylin-Färbung durchgeführt. Dieser basische Farbstoff färbt die basophilen Kerne blau an. Die anderen Schnitte wurden über Nacht getrocknet und dann weiter für die Immunhistochemie verwendet, andernfalls im Kühlschrank gelagert.

Tabelle 3: Übersicht über die benötigten Materialien

Tissue-Tek Cryomolds, Miles, Elkhart, USA
Tissue-Tek Kryomedium, Sakura, Zoeterwonde, Niederlande
Kryostat: Leica CM 1900
Silane prep slides, Sigma, St. Louis, USA
Hämatoxylinlösung nach Ehrlich, Hollborn & Söhne, Leipzig, Deutschland
1,8 ml Kryoröhrchen, Greiner Labortechnik, Deutschland

3.4 Immunhistochemischer Nachweis von *Borrelia burgdorferi* in Gewebekulturen

Mit Hilfe der Immunhistochemie lässt sich das Verteilungsmuster bestimmter Proteine im Gewebeschnitt darstellen. Das Prinzip beruht darauf, dass zunächst ein (primärer) Antikörper, der gegen das darzustellende Protein gerichtet ist, angelagert wird. In einem zweiten Schritt wird ein mit Alkalischer Phosphatase konjugierter anti-Antikörper (sekundärer Antikörper) angekoppelt. Dieser kann durch ein Substrat, das von der Alkalischen Phosphatase umgesetzt wird, sichtbar gemacht werden (s. Abbildung 2).

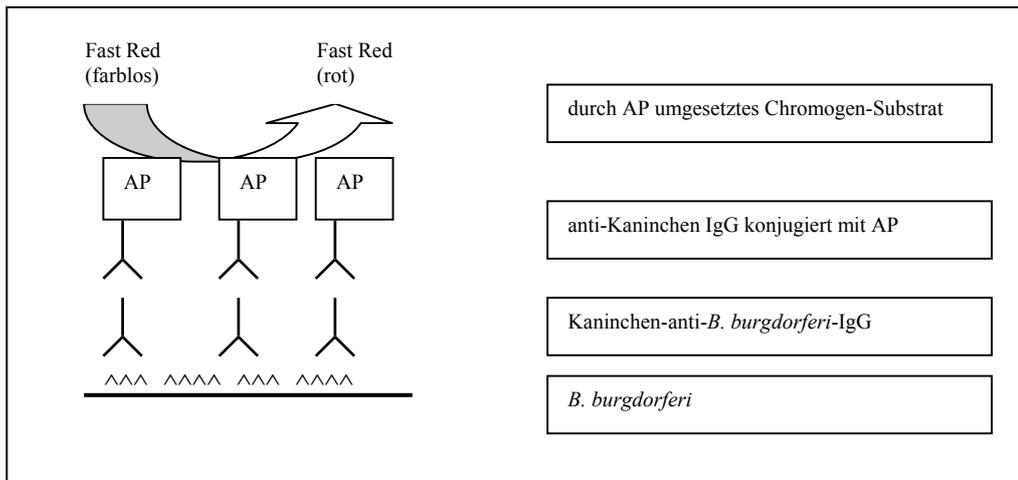


Abbildung 2: Prinzip der Immunhistochemischen Färbung mit Hilfe der Alkalischen Phosphatase

Die Färbung erfolgte in einer feuchten Kammer, um ein Austrocknen der Schnitte zu vermeiden. Zunächst wurden die getrockneten Gefrierschnitte 15 Minuten in 4%iger Formaldehydlösung fixiert und anschließend mit 0,1 M Tris Buffered Saline-Lösung (TBS) gewaschen. Mit einem Gummistift wurden die Schnitte auf den Objektträgern umrandet. Um eine unspezifische Hintergrundfärbung zu vermeiden, wurde mit einer 4%igen TBS-Milchpulverlösung, die 10 % Pferdeserum enthielt, 30 Minuten geblockt. Nach erneuter Spülung (erfolgte immer mit 0,1 M TBS) wurde die Primärmarkierung mit 1:100 in 2%iger TBS-Milchpulverlösung verdünntem Kaninchen-anti-*B. burgdorferi*-IgG durchgeführt. Pro Objektträger wurde eine Negativkontrolle mit einer Kaninchen-IgG-Fraktion gemacht (Verdünnung 1:200). Die Präparate wurden für 30 Minuten inkubiert und anschließend, wie oben beschrieben, gewaschen.

Die Sekundärmarkierung erfolgte mit Alkalischer Phosphatase konjugiertem anti-Kaninchen-Antikörper von der Ziege (Kit DAKO EnVision). Nach 30 Minuten Inkubationszeit und Spülung wurde zum Kit gehörendes Fast Red als Substrat auf die Objektträger gegeben. Endogene Phosphatasen wurden mit Levamisol gehemmt. Durch die enzymatische Umsetzung entstand am sekundären Antikörper eine rote Färbung.

Die Schnitte wurden zum Darstellen der Zellen mit Hämatoxylin gegengefärbt (Anfärbung der Kerne) und anschließend mit wässrigem Eindeckmedium eingedeckelt.

Tabelle 4: Benötigte Materialien für die Immunhistochemie

Formaldehyd-Lösung, 4% gepuffert, Herbeta Arzneimittel, Berlin, Deutschland
Tris Buffered Saline (TBS), Sigma, Steinheim, Deutschland
Gummistift Dako, Hamburg, Deutschland
Milchpulver
Pferdeserum, Biochrom, Berlin, Deutschland
Kaninchen-anti- <i>B. burgdorferi</i> - IgG (polyklonal), Quartett [enthält 83,41,34 und 31 kD Proteine von <i>Borrelia burgdorferi</i>]
Kaninchen-IgG-Fraktion, DAKO, Dänemark
DAKO EnVision System AP, DAKO Cooperation, Kalifornien, USA mit folgenden Bestandteilen:
anti-Maus und anti-Kaninchen Polymer, konjugiert mit AP
Fast Red-Tabletten
Fast Red Substrat Chromogen Lösung
Levamisol (Hemmung der endogenen Phosphatasen)
Aquatex, Merck, Darmstadt, Deutschland

3.5 Nachweis von Metalloproteinasen im Kulturüberstand mittels Zymographie

Die Zymographie basiert auf einer Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE), wobei die durch das Gel wandernden Proteine mit negativ geladenem Natriumdodecylsulfat (SDS) beladen und dann ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Im Gegensatz zur herkömmlichen SDS-PAGE enthält das Zymographie-Gel zusätzlich Gelatine, so dass über Nacht inkubierte, Gelatinasen (MMP-2, MMP-9) enthaltende Proben das Substrat enzymatisch abbauen können. Wurde die Gelatine abgebaut, bilden sich in dem ansonsten blau gefärbten Gelatinegel helle Banden, die auf die Aktivität der Gelatinasen hinweisen.

Zunächst wurde ein homogenes 7,5%iges Trenngel hergestellt (siehe Tabelle 5: Übersicht über die Gelzusammensetzung). Zur Polymerisation wurden Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethyläthylendiamin (TEMED) hinzugefügt. Das Gel wurde in den Gießstand gegeben und mit wassergesättigtem Isobutanol überschichtet. Nach 2 Stunden war es auspolymerisiert und das Sammelgel konnte aufpipettiert werden. Ein Kamm zur Bildung der gewünschten

Taschenanzahl zur Aufnahme der Proben wurde vorsichtig in das Gel eingeführt. Bis zum vollständigen Auspolymerisieren mußte eine Stunde gewartet werden bzw. wurde das Gel über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt.

Das Gel wurde in der Elektrophoresekammer mit Laufpuffer überschichtet. 1 µl der zu untersuchenden Probe wurden mit 4 µl Probenpuffer nach Laemmli gemischt und auf 16 µl mit Laufpuffer aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben mit einer feinen Kanüle vorsichtig in die Taschen eingegeben. Außerdem wurden Marker für MMP-2 (72 kDa) und MMP-9 (92 kDa) als Standard einzeln in zwei Geltaschen gegeben. Die Proben durchwanderten das Sammelgel bei 15 mA in 20 Minuten, dann wurde die Stromstärke auf 20 mA erhöht (Werte für eine Kammer; bei zwei Kammern doppelte Stromstärken notwendig). Innerhalb von zwei Stunden erfolgte eine Auftrennung der Proteine.

Nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel abgetrennt und zur Entfernung des SDS aus dem Gel und den Banden das Trenngel in einem Triton X-100-haltigen Puffer gewaschen (zwei Stunden unter viermaligem Pufferwechsel). Danach wurde das Gel in Inkubationspuffer gespült und über Nacht (ca. 16 Stunden) bei 37 °C in Inkubationspuffer im Schüttler inkubiert (optimale Bedingungen für die enzymatische Wirkung der Gelatinasen).

Die Färbung erfolgte in einer Coomassie-Färbelösung (0,2 % Coomassie in Entfärberlösung) im Schüttler für eine Stunde. Anschließend wurde das Gel mit Entfärber (45 % Methanol, 10 % Essigsäure) unter mehrmaligem Wechsel der Lösung so entfärbt, dass die Banden sich deutlich von dem blauen Hintergrund abhoben. Nach Spülung in Aqua dest. und Einweichen in Glycerin-Aquadest konnte das Gel für drei Tage im Trocknungsrahmen trocknen.

Tabelle 5: Übersicht über die Gelzusammensetzung

Trenngel (7,5 % Acrylamid, 0,1 % Gelatine)	30 % Acrylamid-Bis solution	1,75 ml
	0,3%ige Gelatinestammlösung	2,33 ml
	4x unterer Gelpuffer	1,75 ml
	Aqua dest.	1,10 ml
	10%ige APS-Lösung	21 μ l
	TEMED	10,5 μ l
Sammelgel (5 % Acrylamid, keine Gelatine)	30 % Acrylamid-Bis solution	334 μ l
	4x oberer Gelpuffer	500 μ l
	Aqua dest.	1186 μ l
	10%ige APS-Lösung	6 μ l
	TEMED	3 μ l

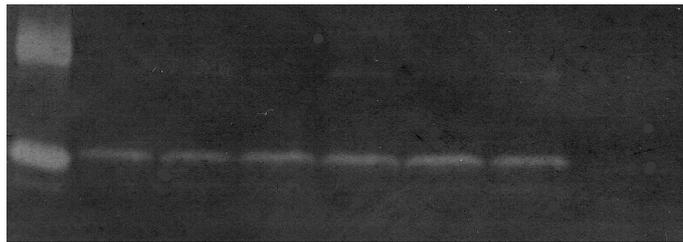


Abbildung 3: Zymographie-Gel

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Puffer

4x unterer Gelpuffer für Trenngel:	1,5 Mol/l Tris base 0,4 % SDS → mit 5N HCl auf pH 8,8 einstellen
4x oberer Gelpuffer für Sammelgel:	0,5 Mol/l Tris base 0,4 % SDS → mit 5N HCl auf pH 6,8 einstellen
4x Probenpuffer nach Laemmli:	10 % SDS = 1 g 25 % Glycerol = 2,5 g 5 ml 4x oberer Gelpuffer → ad 10 ml Aqua dest. Lösen Bromphenolblau 4 mg/10 ml 4x Probenpuffer
10x Laufpuffer-Stammlösung:	0,25 Mol/l Tris base 1,89 Mol/l Glycin 1% SDS → pH sollte ohne Einstellung 8,3 sein
Waschpuffer 1x	50 mM Tris-HCl 10 mM CaCl ₂ 2,5 % Triton X-100 0,02 % NaN ₃ → pH auf 7,5 einstellen
Inkubationspuffer 1x	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl ₂ 10 mM CaCl ₂ 0,02 % NaN ₃ → pH auf 7,5 einstellen

3.6 Nachweis von Interleukin-18, MMP-1, MMP-3 und TIMP-1 in Seren und in Kulturüberständen

Für den Nachweis von Proteinen in Seren von Borreliosepatienten, RA-Patienten und Normalspendern sowie in Kulturüberständen wurden kommerziell erhältliche ELISA-Kits verwendet, in denen alle für die Durchführung benötigten Materialien enthalten waren. Diese wurden nach der Rezeptur des Herstellers angewendet.

IL-18:

Hierfür wurde ein Kit von Diaclone, Besancon, Frankreich benutzt, der die inaktive und aktive Form von IL-18 erkennt. Es handelt sich dabei um einen sogenannten Sandwich-ELISA. Das Prinzip ist in Abbildung 4 gezeigt. Die 96 Wells einer Polystyrene Mikrotiterplatte sind mit einem polyklonalen anti-IL-18-Antikörper beschichtet. Zunächst wird der IL-18-Standard in einer Konzentration von 2000 pg/ml angesetzt. Mit Hilfe eines Standardverdünners wird anschließend eine IL-18-Verdünnungsreihe von 2000 bis 62,5 pg/ml hergestellt, die als Doppelbestimmung in die Wells einpipettiert wird (100 µl/Well). Als Blankwert dienen 100 µl des Verdünners. Die zu messenden Proben werden auf Raumtemperatur gebracht und je 100 µl unverdünnt in die Wells gegeben. Zusätzlich werden 50 µl eines biotinylierten polyklonalen anti-IL-18-Antikörpers mitinkubiert, und zwar für drei Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wird die Flüssigkeit aus jedem Well entfernt und die Platte mit dem im Kit enthaltenen Waschpuffer drei Mal gewaschen. Nun werden 100 µl der Streptavidin-Peroxidase-Lösung hinzugegeben, die erst direkt vor Gebrauch in dem entsprechenden Verdünner gelöst werden darf. Streptavidin besitzt eine hohe Bindungsaffinität zu Biotin und lagert sich dem biotinylierten anti-IL-18-Antikörper an. Nach 30 Minuten Inkubationszeit wird die Platte wieder drei Mal gewaschen und 100 µl des Substrates Tetramethylbenzidin (TMB) in jedes Well pipettiert. Dieses wird von der gebundenen Meerrettich-Peroxidase umgesetzt. Durch Zugabe von 1M Schwefelsäure wird die Reaktion gestoppt. Das Ergebnis kann innerhalb von einer halben Stunde im Photometer bei 450 nm abgelesen werden. Die ermittelte Farbintensität bei 450 nm ist proportional zur IL-18-Konzentration der Proben. Die Sensitivität des Tests beträgt < 45 pg/ml.

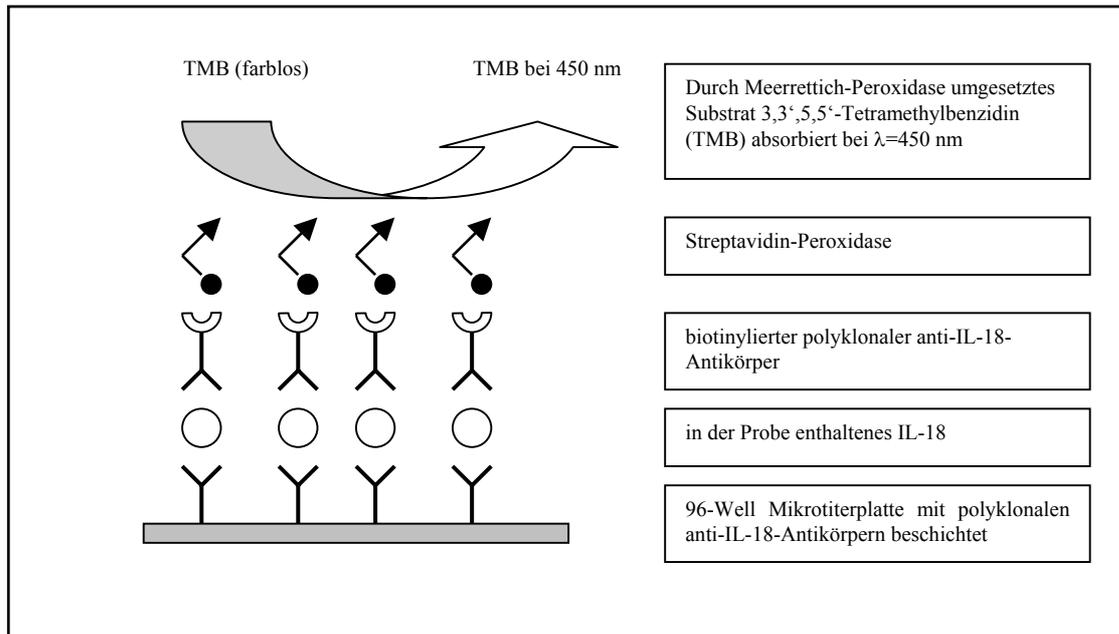


Abbildung 4: Prinzip der IL-18-Detektion mittels Sandwich-ELISA

MMP-1:

Der Kit stammt von der Firma Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England. Er misst die Totalmenge an MMP-1, also sowohl freies MMP-1 als auch an TIMP-1 komplexgebundenes MMP-1. Auch hierbei handelt es sich um einen Sandwich-ELISA, der dem Prinzip des IL-18-ELISAs entspricht. Die Böden der Mikrotiterplatten sind mit monoklonalen anti-MMP-1-Antikörpern beschichtet. Der Standard von MMP-1 wird als Doppelbestimmung in Konzentrationen von 6,25–100 ng/ml aufgetragen, wobei die Sensitivitätsgrenze des Testsystems bei 1,7 ng/ml liegt. Um einen optimalen Messbereich zu erlangen, wurden die zu bestimmenden Seren mit einem zum Kit gehörenden Verdünnungspuffer 1:5 verdünnt, die Gewebekulturüberstände 1:10. Der Standard bzw. das in den Proben vorhandene MMP-1 bindet während einer zweistündigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur an die im Well gebundenen Antikörper. Die Platten werden vier Mal gewaschen, danach wird der sekundäre Antikörper (aus Kaninchen stammender anti-MMP-1-Antikörper) einpipettiert und wieder zwei Stunden inkubiert. Nach einem erneuten Waschen wird ein anti-Kaninchen-Peroxidase-Konjugat (stammt aus Eseln) hinzugegeben und erneut für eine Stunde inkubiert. Auch hier dient als Substrat TMB, der Messvorgang entspricht dem bei IL-18.

MMP-3:

Der MMP-3-ELISA stammte ebenfalls von der Firma Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England. Er erkennt die Totalmenge an MMP-3, also pro-MMP-3, aktives MMP-3 sowie MMP-3/TIMP-Komplexe. Die Böden der Mikrotiterplatte sind mit anti-MMP-3-Antikörpern beschichtet. Der zugegebene MMP-3-Standard umfasst einen Messbereich von 3,75–120 ng/ml. Die Sensitivität beträgt 2,35 ng/ml. Die Seren wurden 1:8 verdünnt, die Überstände mussten 1:300 verdünnt werden, was mit dem zum Kit gehörenden Puffer erfolgte. Die Erstinkubation dauert eine Stunde und erfordert eine Temperatur von 2–8 °C (Kühlschrank). Nach viermaligem Waschen der Wells wird kaltes anti-MMP-3-Peroxidase-Konjugat hinzugegeben und zwei Stunden bei 2–8 °C inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wird TMB einpipettiert. Nach einer Einwirkzeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur lässt sich die Farbintensität im Photometer bei 450 nm ablesen.

TIMP-1:

Dieser Kit stammte ebenfalls von der Firma Amersham und misst die Totalmenge an TIMP-1. Für die Seren wurde eine optimale Verdünnung von 1:50 ermittelt, für die Kulturüberstände 1:300. Der TIMP-1-Standard rangierte im Bereich von 3,13 bis 50 ng/ml. Die Erstinkubation (von Standard und Proben) erfolgte bei Raumtemperatur für zwei Stunden. Anschließend wurde gewaschen und pro Well mit 100µl eines anti-TIMP-1-Peroxidase-Konjugates für zwei Stunden inkubiert. Die Ablesung konnte nach einer halbstündigen Substratumsetzung (TMB) wie oben bereits beschrieben am Photometer abgelesen werden. Die Sensitivität dieses Tests liegt bei 1,25 ng/ml.

3.7 Molekularbiologische Untersuchungen an Gewebeexplantaten

Von den eingefrorenen Gewebeexplantaten wurde mittels eines Rneasy Mini Kits (von Quiagen, Kalifornien, USA) die RNA extrahiert, diese anschließend mittels Oligonukleotidprimer in cDNA umgeschrieben und damit eine Realtime-PCR durchgeführt. Die einzelnen Schritte werden im folgenden beschrieben.

3.7.1 RNA-Isolierung und Konzentrationsbestimmung

Um eine Kontaminationsgefahr durch RNAsen möglichst gering zu halten, wurden für diesen Arbeitsschritt nur spezielle, RNase freie Materialien (Pipetten, Pipettenboxen, Lösungen usw.) verwendet. Der Arbeitstisch wurde gereinigt und als letztes mit RNasin abgewischt. Die Proben wurden in einer Eisbox gelagert. Zu Beginn musste das Gewebe zerkleinert werden. Das erfolgte mittels eines Metallmörser. Dieser wurde mit flüssigem Stickstoff vorgekühlt, das Gewebe mit einem Pistill homogenisiert und anschließend in ein 2 ml-Eppendorf tube überführt. Pro Gewebe wurden 500µl RLT-Puffer (Lysepuffer aus dem Kit von Quiagen) hinzugegeben. Bei diesem Puffer handelt es sich um eine Guanidinisothiocyanat-haltige Lösung. Guanidinisothiocyanat denaturiert als sogenanntes chaotropes Salz Proteine und inaktiviert RNAsen. Als Oxidationsschutz (zur Stabilisierung der RNA) wurden 7µl Mercaptoethanol hinzugegeben. Anschließend wurden die Zelltrümmer für 2 Minuten bei maximaler Umdrehungszahl abzentrifugiert. Der Überstand, der Proteine, DNA und RNA enthält, wurde in ein neues Eppendorf tube überführt. Die nun folgende Phenol-Extraktion („single step“ Methode) dient dazu, die RNA aus dem vorhandenen Überstand zu isolieren. Das Verfahren beruht darauf, dass sich durch die Zugabe von Phenol zwei Phasen bilden: in der oberen wässrigen Phase sammelt sich die RNA, die untere angesäuerte Phenolphase enthält Proteine und Zelldetritus. In der Interphase befindet sich die DNA. Zu 500µl Lysepuffer (= Probe) wurden 50µl 2M Natriumacetat (zum Ansäuern auf pH 4,0) gegeben, außerdem 500µl wassergesättigtes Phenol (pH 4,0) und 100µl Chloroform/Isoamylalkohol (Verhältnis 24:1) zur besseren Phasentrennung (bei fettreichen Geweben 150–200 µl). Die Lösung wurde zwischendurch gut geschüttelt, bis sie milchig war, anschließend 5 Minuten auf Eis gestellt und bei 4 °C 12800 U für 20 Minuten abzentrifugiert. Von den nun sichtbaren zwei Phasen konnte der wässrige Überstand (ca. 400–450 µl) vorsichtig abgenommen werden, ohne dass die Trennphase aufgewirbelt oder berührt wurde. Dieser wurde in ein neues Tube überführt und das gleiche Volumen vorgewärmter 85 % Alkohol+DEPC-Wasser hinzugegeben und gevortext. Die weitere Vorgehensweise erfolgte wie in der Kit-Anweisung beschrieben. 700µl Probe wurden auf eine im Tube stehende Säule pipettiert, an deren Silikongelmembran die gesamt-RNA binden konnte. Die nicht gebundenen Teile wurden bei 10000 Umdrehungen 15 Sekunden abzentrifugiert und die Säule anschließend mit 700µl Waschpuffer (RW1) gewaschen, die Flüssigkeit abzentrifugiert und die Säule mit dem RPE-Puffer (mit Ethanol) zweimal gewaschen. Anschließend wurde die Säule durch zweiminütiges Zentrifugieren getrocknet, was gewährleistet, dass kein Rest Ethanol auf der Membran verbleibt. Die Säule mit der gebundenen RNA wurde in ein Sammeltube gestellt und 30µl

50 °C vorgewärmtes RNase-freies Wasser (oder DEPC-Wasser) zur Elution auf die Säule gegeben und abzentrifugiert. Bei dem gewonnenen Zentrifugat handelt es sich um die isolierte gesamt-RNA.

Zur Quantifizierung der RNA wurde die optische Dichte von 2 µl der Probe in einer 1:36-Verdünnung (mit sterilem Wasser) bei 260 nm im Photometer (GeneQuant II, Pharmacia Biotech) gemessen. Als Referenzwert diente eine Küvette mit Aqua dest. Dadurch konnte die Konzentration der RNA ermittelt werden. Zur Reinheitsprüfung (Proteinkontamination) wurde die Ratio bestimmt (Verhältnis OD_{260}/OD_{280}), um eine Aussage über vorhandene Proteinkontamination zu machen. Die Ratio sollte in einem Bereich zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

Um die RNA visuell darzustellen und um eventuell vorhandene Kontaminationen wie DNA oder RNA-Abbauprodukte zu erkennen, wurde außerdem eine Gelelektrophorese durchgeführt. 0,3g Agarose wurden in 30 ml TAE (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) durch Erwärmung gelöst (1%iges Gel) und 5µl Ethidiumbromid hinzugegeben. Anschließend konnte das Gel im Gießstand innerhalb von 20 Minuten fest werden. 2µl eluierte RNA-Probe wurden mit 2µl Probenpuffer (zur Erhöhung der Dichte und zum Sichtbarmachen der Probe während des Laufs) und 2µl sterilem Wasser verdünnt und davon 5µl in eine Geltasche einpipettiert. Als Größenstandard diente ein Low DNA Marker (Verdünnung ebenso wie die Probe). Die Proben wurden innerhalb von 25 Minuten bei 70mA aufgetrennt und die entstandenen Banden anschließend unter einer UV-Lampe ausgewertet. Abbildung 5 zeigt eine unkontaminierte RNA-Probe mit deutlicher Auftrennung der gesamt-RNA in 18 und 28 Svedberg Untereinheiten.

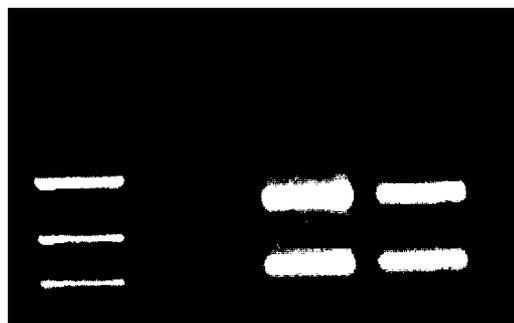


Abbildung 5: Auftrennung der RNA in 28 und 18 Svedberg Untereinheiten, links der Standard

3.7.2 Reverse Transkription

Da für die PCR als Ausgangsmaterial DNA benötigt wird, musste die eluierte RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. 10 µl der RNA-Probe wurden mit 1 µl Oligo-dT-Primer, der an den Poly-A-Schwanz von mRNA bindet, in ein 0,5 ml Eppendorf tube pipettiert. Der Ansatz wurde bei 80 °C für 5 Minuten erhitzt und anschließend für zwei Minuten auf Eis gestellt. Bei diesem Vorgang brechen die Sekundärstrukturen der RNA auf und die Primer lagern sich an (Annealing). In der Zwischenzeit wurde der Reaktionsmix angesetzt: pro Probe 4 µl 5 * 1st Strand Buffer, 2µl DTT, 1 µl Reverse Transkriptase, 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM) und 1 µl RNase Inhibitor. Dieser Mix wurde für 2 Minuten auf 43 °C erwärmt und dann 9 µl zum Probe/Primer-Mix hinzupipettiert. Das Gesamtvolumen wurde für 1,5 Stunden bei 42 °C erhitzt. Anschließend wurden die Transkriptase bei 72 °C 15 Minuten deaktiviert. Die so erhaltenen 20 µl cDNA wurde mit sterilem Wasser auf 30 µl verdünnt und dienten als Template für die Realtime-PCR. Zur Kontrolle der Umschreibung wurde eine PCR durchgeführt, wobei ein spezifischer Primer für das GAPDH-Gen (GAPDH₂₂₉) eingesetzt wurde. Das Protokoll entsprach dem unter 3.7.3 beschriebenen. Die cDNA wurde bei -80 °C gelagert

Tabelle 7: Übersicht über die benötigten Materialien

Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ Primer (0,5 mg/ml), Life Technologies
5 * 1 st Strand Buffer, Gibco BRL
0,1 M 1,4 Dithiothretiol (DTT), Gibco BRL
desoxy-NTP Set, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Superscript TM II Rnase H (Reverse Transkriptase), Life Technologies
Rnasin Ribonuclease Inhibitor, Promega Corporation, USA
DNA Längenstandard IV, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

3.7.3 Auswahl der Primer und deren Temperaturoptima mittels konventioneller PCR

Zur PCR benötigt man eine thermostabile Polymerase, Ausgangs-DNA (Template), zwei passende Oligonukleotidprimer, Puffer und Nukleotide. Bei der Denaturierung werden die Doppelstränge aufgespalten, bei anschließender niedrigerer Temperatur lagern sich die Primer an die Einzelstränge an (Annealing) und bei 72 °C, dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase, erfolgt die Zweitstrangsynthese (Elongation). Um eine optimale Durchführung

der Realtime-PCR zu gewährleisten, wurden zunächst mit Hilfe einer konventionellen PCR die optimalen Annealing-Temperaturen der Primer für IL-18, MMP-1, MMP-2; MMP-3, MMP-9 ermittelt. Die optimalen Temperaturen für TNF- α und IL-1 β waren bereits bekannt (62 °C, übernommen von U. Ungethüm). Als „house keeping genes“ wurden Primer für das ubiquitäre Enzym GAPDH und den Zytoskelettbestandteil β -Actin verwendet. Als Template diente eine Test-cDNA. Die Primer sind in Tabelle 9 aufgelistet. Das Pipettierschema des Mastermixes sowie das PCR-Programm sind in Tabelle 10 zusammengestellt. Bei jedem Ansatz lief ein Leerwert mit (gleicher Ansatz ohne cDNA). Die PCR-Produkte (Amplifikate) wurde in einem 2%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (5 μ l Amplifikat + 1 μ l Ladepuffer pro Geltasche) und mittels Ethidiumbromid-Einlagerung im UV-Licht sichtbar gemacht.

Tabelle 8: Accessionnumbers der verwendete Primer

TNF α	X01394	MMP-2	J05471
IL-1 β	M15330	MMP-9	AF148064/1
MMP-1	X05231	IL-18	E17135
MMP-3	X05232	β -Actin	X00351

Tabelle 9: Ansatz für den Mastermix und PCR-Programm

einfacher Ansatz		Programm	
Aqua braun	20,35 μ l	94 °C für 3 min.	} 40 Zyklen
Reaktionspuffer	2,5 μ l	94 °C für 30 sec.	
dNTPs (10 mM)	0,5 μ l	58/60/62 °C für 1 min.	
Taq Polymerase	0,15 μ l	72 °C für 1,5 min.	
Primer	1,0 μ l	72 °C für 10 min.	
cDNA	0,5 μ l	4° C unbegrenzt	

Als optimale Annealing-Temperaturen wurden für MMP-1, MMP-2 und MMP-9 64 °C , für IL-18 58 °C und für MMP-3 62 °C ermittelt. Abbildung 6 zeigt einen Bandenvergleich bei 62 °C und 64 °C von Primern für MMP-1 und MMP-2.

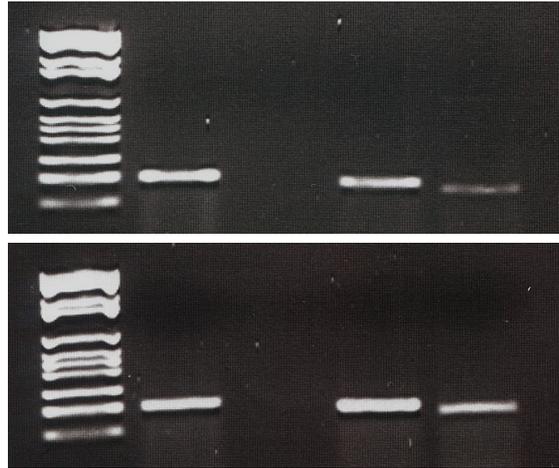


Abbildung 6: Primer von MMP-1 und MMP-2 (rechts) bei 62 °C (oben) und 64 °C (unten); links Standard und GAPDH-Kontrolle

3.7.4 Semiquantitative Realtime-detection-PCR

Die Realtime-detection-PCR ist die modernste Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren. Dadurch ist es möglich, über den gesamten Reaktionsverlauf hinweg die Amplifizierung der Ausgangs-DNA zu verfolgen und innerhalb des linearen Anstiegsbereiches die DNA-Menge zu ermitteln. Die einzelnen Schritte basieren auf einem klassischen PCR-Programm in drei Schritten (s. 3.7.3). Die Hot Start Technik setzt zusätzlich einen weiteren Schritt zu Beginn ein (95 °C für 3 Minuten), wobei die AmpliTaq Gold aktiviert wird. Die optimalen Annealingtemperaturen der unterschiedlichen Primer wurden mittels herkömmlicher PCR ermittelt (s. 3.7.3). Sie sind abhängig von der Schmelztemperatur des Primers (T_m), d.h. der Temperatur, bei der 50 % des Primers nicht mehr an die cDNA binden. In den Vorversuchen wurde die charakteristische Schmelztemperatur (T_m) für jeden Primer ermittelt, damit in der anschließenden Auswertung Sicherheit darüber bestand, daß das amplifizierte Produkt dem eingesetzten Primer entspricht.

Das Prinzip der Quantifizierung bei der Realtime-PCR beruht auf der unspezifischen Bindung des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green an die doppelsträngige DNA (s. Abb. 7). Die Fluoreszenzintensität des interkalierenden Farbstoffes verhält sich proportional zur neugebildeten DNA-Menge. Die durch die Bestrahlung mit einer Weißlichtlampe erzeugte Fluoreszenz wird durch eine Kamera aufgezeichnet. Die Software bestimmt für jede Probe den ΔR_n -Wert (normalized reporter). ΔR_n errechnet sich aus der Differenz des R_n^+ -Wertes einer Template-haltigen Probe und des R_n^- -Wertes einer Probe ohne DNA. Diese beiden R_n -Werte errechnen sich aus der Emissionsintensität von SYBR Green bezogen auf die

Emissionsintensität der passiven Referenz (ROX-Farbstoff), die im 10* SYBR Green Puffer enthalten ist.

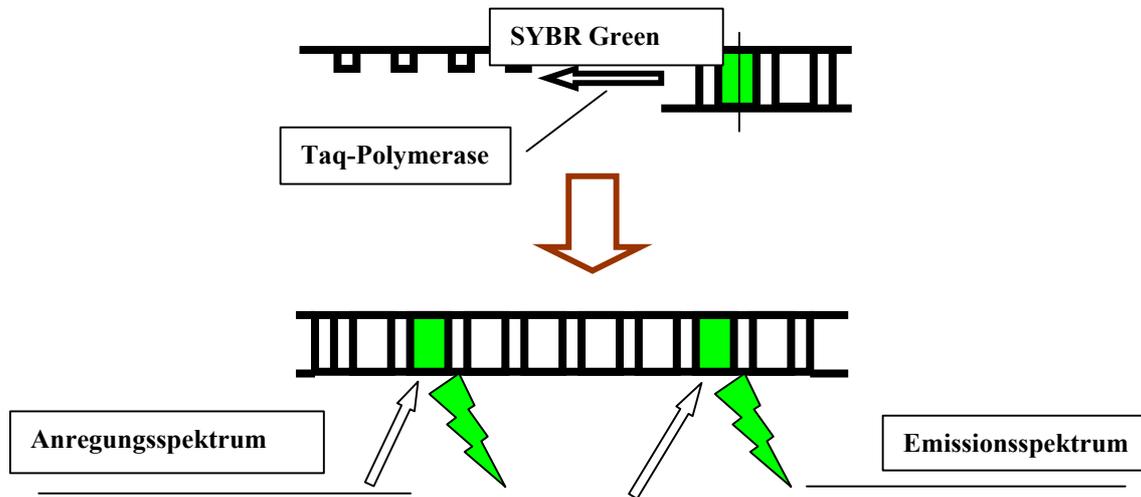


Abbildung 7: Lichtemission des in doppelsträngige DNA interkalierten SYBR Green Farbstoffes

Für die Real-Time Quantifizierung errechnet der Computer einen amplifikation plot, bei dem der ΔR_n -Wert gegen den sog. threshold cycle (C_T) aufgetragen wird. Zu Beginn der Reaktion findet beinahe keine Erhöhung des Fluoreszenzsignales statt. In diesem Bereich liegt die baseline des amplifikation plots. Ein Anstieg der Fluoreszenz über diese baseline markiert den Eintritt der Reaktion in den exponentiellen Bereich. Da in diesem Abschnitt der Reaktion, im Gegensatz zur Plateauphase gegen Ende der Reaktion, keine Hemmung durch Reaktionsprodukte zu erwarten ist, wird hier der C_T abgelesen, der zur Quantifizierung des PCR-Produktes verwendet wird. Je höher also der ΔR_n , desto früher schneidet der threshold die Funktion, so dass daraus ein niedriger C_T -Wert entsteht.

Um eine semiquantitative Expressionsanalyse machen zu können, wurde von jeder Probe neben dem zu untersuchenden Primer auch eine PCR mit einem sog. „house keeping gene“ durchgeführt. Es handelt sich dabei um ein Gen, das in jeder Zelle exprimiert wird. Das hier benutzte Gen war der Zytoskelettbaustein β -Actin. Die Semiquantifizierung erfolgte, nachdem die C_T -Werte für die zu untersuchenden Gene wie oben beschrieben ermittelt worden waren, indem die Differenz aus dem C_T -Wert des „house keeping genes“ und dem C_T -Wert des zu untersuchenden Genes gebildet wurde (ΔC_T). Da im amplifikation plot der ΔR_n logarithmisch aufgetragen wird, muß der Semiquantifizierungswert als $2^{\Delta C_T}$ ausgedrückt

werden. Die Expressionsrate des untersuchten Genes wird als prozentualer Anteil der β -Actin-Expression angegeben.

Für die Realtime-PCR wurde ein SYBR Green Kit (Perkin-Elmer, USA) verwendet. Die Primer wurden von der Firma TIB MolBiol synthetisiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die cDNA-Proben wurden mit 7 verschiedenen Primern untersucht. Zusätzlich wurde für jeden Primer eine „no-template-control“ (NTC) angesetzt, die als Kontrollmechanismus für Primerverunreinigungen diente. Wenn sauber gearbeitet wird, dürfen in diesem Ansatz keine Amplifikate gebildet werden. Zusätzlich lief für jeden Primeransatz eine Test-cDNA mit, die als Positivkontrolle eingesetzt wurde. Die Proben wurden auf eine 96-Well Platte aufgetragen. Zuerst wurde in zwei 1,5 ml-Eppendorf Tubes ein Mastermix aus allen Reagenzien, abgesehen von cDNA und Primer, erstellt (s. Tabelle 10). Dieser wurde anschließend gevortext und abzentrifugiert, um dann auf die 0,5 ml-Tubes entsprechend der Probenanzahl verteilt zu werden. In diese Tubes wurden nun $0,5\ \mu\text{l}$ der zuvor bei Raumtemperatur aufgetauten cDNA zugegeben. Es wurde wiederum gevortext und abzentrifugiert. Die Tubes wurden auf Eis gestellt. Nun wurden die Primer 1:5 mit sterilem Wasser verdünnt.

In jedes Well der 96-Well Platte wurden $5\ \mu\text{l}$ Primer-Mix vorgelegt. Danach wurden jeweils $20\ \mu\text{l}$ des bereits mit cDNA versetzten Mastermixes in ein Well pipettiert und mit dem Primer vermischt. Die Platte wurde mit Caps verschlossen und 10 min. bei 1500 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Anschließend wurde die Platte in den Heizblock des GeneAmp 5700 gestellt und durch die Kamera abgedeckt. Daraufhin wurde die Software gestartet und das zuvor eingestellte PCR-Programm (s. Tabelle 11) konnte ablaufen. Begonnen wurde mit einem 2 minütigen Zyklus bei $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ zur Inkubation der AmpErase UNG, was verhindern sollte, dass verschleppte PCR-Produkte mitamplifiziert werden.

Tabelle 10: Mastermix und Temperaturprogramm für die Realtime-PCR

einfacher Ansatz:		Programm:	
Aqua braun	11,6 μl	50 $^{\circ}\text{C}$ für 2 Minuten	
dNTPs	2,0 μl	95 $^{\circ}\text{C}$ für 10 Minuten	
SYBR Green	2,5 μl	95 $^{\circ}\text{C}$ für 15 Sekunden	} 40 Zyklen
MgCl ₂	3,0 μl	58-64 $^{\circ}\text{C}$ für 30 Sekunden	
UNG	0,25 μl	72 $^{\circ}\text{C}$ für 1 Minute	
AmpliTaQ Gold	0,15 μl		

Nach Ablauf des Programms wurden die von der Software aufgezeichneten Daten wie oben beschrieben ausgewertet. Die Gültigkeit des Versuches wurde jeweils dadurch bestimmt, dass die mitlaufenden Leerwerte (NTC) kontrolliert wurden. Das Semiquantifizierungsergebnis wurde danach in die Auswertung aufgenommen.

Tabelle 11: Überblick über die verwendeten Materialien

GeneAmp 5700 Sequence Detection System, Perkin Elmer Biosystems, USA
Primer Express Software, Perkin Elmer Biosystems, USA
MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate, Perkin Elmer Biosystems, USA
MicroAmp Optical Caps, Perkin Elmer Biosystems, USA
AmpliAq Gold® DNA Polymerase, Perkin Elmer Biosystems, USA
10* SYBR Green PCR Puffer, Perkin Elmer Biosystems, USA
AmpErase® UNG mit 1 U/µl Uracil-N- Glycosylase, Perkin Elmer Biosystems, USA
dNTP MIX mit 2,5 mM dATP, 2,5 mM dCTP, 2,5 mM dGTP, 5,0 mM dUTP, Perkin Elmer Biosystems, USA
MgCl ₂ (25 mM) (Perkin Elmer Biosystems, USA)
Primer (100 pmol/µl), TIB MolBiol, USA

3.8 Herkunft der Patientenseren für die serologischen Untersuchungen

Die Seren stammten von Patienten mit klinisch manifester Lyme-Arthritis, die innerhalb der letzten 3 Jahre in der Charité behandelt wurden. Darüber hinaus wurden Seren von Patienten mit anderen Manifestationsformen der Lyme-Borreliose herangezogen, nämlich mit Erythema migrans (EM), Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA), Neuroborreliose (NB), Lyme Karditis und ophthalmologischen Manifestationsformen. In allen Patientenseren waren Antikörper gegen *B. burgdorferi* nachweisbar, ein Teil hatte einen positiven Borrelien-PCR-Befund im Urin (genaue Angaben s. Tabelle 12). Die Seren der Patienten mit Erythema migrans und Acrodermatitis chronica atrophicans wurden freundlicherweise von Frau Prof. Aberer aus Graz zur Verfügung gestellt. Als Kontrollgruppen dienten Normalspenderseren vom Blutspendedienst der Charité sowie Seren von Patienten mit Rheumatoider Arthritis aus der Rheumatologie der Charité.

Tabelle 12: Überblick über die in der Studie untersuchten Seren

IL-18	seropositive Lyme-Arthritis	n = 65 (davon 13 PCR-pos.)
	andere Manifestationsformen	n = 35 (davon 13 ACA, 11 EM, 6 NB, 5 andere)
	Normalspender	n = 37
	Rheumatoide Arthritis	n = 12
MMP-1	Lyme-Borreliose	n = 19
	Normalspender	n = 12
MMP-3	Lyme-Arthritis	n = 19
	andere Manifestationsformen	n = 23 (davon 11 ACA, 10 EM, 2 andere)
	Normalspender	n = 22
TIMP-1	Lyme-Borreliose	n = 16 (davon 16 PCR-pos.)
	Normalspender	n = 16

3.9 Statistische Methoden

Für den Vergleich der gemessenen ELISA-Werte in Seren wurde der U-Test nach Mann und Whitney (Wilcoxon-Test) für unverbundene Stichproben herangezogen. Der Test wurde ebenfalls für den Vergleich der Anstiegsverhältnisse in infizierten und uninfizierten Gewebekulturüberständen durchgeführt. Er ist geeignet für den Vergleich unabhängiger, nicht-normalverteilter Meßwerte. Der Bewertung wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha < 0,05$ zugrunde gelegt.

Die graphische Darstellung des Datenmaterials erfolgte mittels Balkendiagrammen und in Boxplots. Eine Box stellt den Bereich dar, in dem sich 50 % der gemessenen Stichproben befinden. Die untere Begrenzung entspricht der 25 %-Marke, die obere der 75 %-Marke, dazwischen liegt der Medianwert. Die von der Box abgehenden Striche, die maximal 1,5fache Boxenlänge haben, stellen die Streuung der übrigen Werte dar. Ausreißer werden als Einzelpunkte dargestellt (o; *).