

Aus dem Institut für Virologie und Immunologie
der Universität Würzburg

Direktor: Prof. Dr. med. V. ter Meulen

Regulation der Metalloproteinasen
Stromelysin und Collagenase durch
Interferon in retinalen
Pigmentepithelzellen

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Christina Meisenzahl

aus Miltenberg

Würzburg, Mai 2001

Referent: Prof. Dr. C. Jungwirth
Korreferentin: Prof. Dr. med. H. Rückle-Lanz
Dekan: Prof. Dr. med. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 4.12.2001

Die Promovendin ist Ärztin.

Meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet

INHALT

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Anatomische und physiologische Grundlagen der menschlichen Netzhaut	1
1.1.1	Entwicklung und Aufbau der Netzhaut.....	1
1.1.2	Photorezeptoren und retinales Pigmentepithel	2
1.2	Erkrankungen der Netzhaut.....	3
1.2.1	Retinitis pigmentosa	3
1.2.2	Morbus Sorsby	4
1.2.3	Altersabhängige Makuladegeneration (AMD)	5
1.3	Das Interferonsystem	5
1.4	Die Apoptose.....	7
1.5	Matrix Metalloproteinasen und ihre Inhibitoren	8
2	THEMENSTELLUNG	10
3	MATERIAL UND METHODEN	12
3.1	Methoden	12
3.1.1	Führen einer Zellkultur	12
3.1.2	Behandlung der Zellen mit Interferon	12
3.1.3	RNA - Präparation nach der LiCl - Methode	12
3.1.4	RNA-Gelelektrophorese	13
3.1.5	Northern blot-Methode	14
3.1.6	Klonierung eines DNA-Inserts in einen bekannten Vektor	15
3.1.7	Transformation	15
3.1.8	Mini-Präparation.....	16
3.1.9	Anzucht von Bakterien für die Plasmid-Präparation.....	16
3.1.10	Plasmid-Präparation.....	17
3.1.11	Enzymatische Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen	18
3.1.12	DNA-Gelelektrophorese	19
3.1.13	Präparatives DNA-Gel und Elektroelution.....	20
3.1.14	DIG-Markierung der RNA	21
3.1.15	Vorhybridisierung und Hybridisierung	23
3.1.16	Detektion.....	24
3.1.17	Reverse Transkription von Total-RNA	24
3.1.18	PCR (Polymerase-Kettenreaktion)	25
3.2	Material	27

3.2.1	Zellmaterial	27
3.2.2	Interferone.....	27
3.2.3	Reagenzien und Lösungen.....	27
4	ERGEBNISSE	32
4.1	Interferon-Behandlung der ARPE-19-Zelle	32
4.2	Untersuchung des Collagenase-Gens	39
4.2.1	Präparation eines Plasmids mit der genetischen Information des Collagenase-Gens	39
4.2.2	Herstellung einer Digoxigenin-markierten RNA der Collagenase-DNA	41
4.2.3	Vergleich Interferon-behandelter ARPE-19-Zellen mit unbehandelten ARPE-19-Zellen	42
4.2.4	Vergleich unterschiedlich lange mit Interferon behandelte ARPE-19-Zellen	44
4.3	Untersuchung des Stromelysin-Gens	51
4.3.1	Untersuchung des Stromelysin 1-Gens in ARPE 19-Zellen mit der RT-PCR- Methode	51
4.3.2	Nachweis des Stromelysin 1-Gens in humanen Fibroblasten	51
4.3.3	Nachweis des Stromelysin 1-Gens in menschlichen Gliomazellen	53
5	ZUSAMMENFASSUNG	55
6	DISKUSSION	57
7	ANHANG.....	60
7.1	Abkürzungen	60
7.2	Literaturverzeichnis	62

1 EINLEITUNG

1.1 Anatomische und physiologische Grundlagen der menschlichen Netzhaut

1.1.1 *Entwicklung und Aufbau der Netzhaut*

Die Netzhaut ist entwicklungsgeschichtlich ein vorgeschobener Teil des Gehirns [15]. Aus dem inneren Blatt des Augenbechers bildet sich das Stratum nervosum, aus dem äußeren das Stratum pigmentosum retinae. Beide Blätter legen sich aufeinander, ohne jedoch miteinander zu verwachsen. Ein Spaltraum bleibt, der sich später bei Netzhautablösungen mit Flüssigkeit füllt und das innere Blatt der Retina vom Pigmentepithel abhebt. Nur an der Austrittsstelle des Sehnerven, der Ora serrata, sind die beiden Blätter der Retina sowohl miteinander als auch mit der Sklera verwachsen. Die beiden Blätter werden durch den Druck des Glaskörpers und physikalische Anziehungskräfte aufeinander gehalten.

Die Netzhaut besteht aus einem vielschichtigen neuronalen Netzwerk mit Stütz- und Pigmentepithelzellen [25]. Das Pigmentepithel und die Photorezeptoren liegen außen im Anschluß an die Aderhaut. Das Licht trifft die Netzhaut von innen an der den Rezeptoren abgewandten, an den Glaskörper anschließenden Seite. Von außen nach innen sehen wir folgende Zellen: Pigmentepithelzellen, Photorezeptorzellen (Stäbchen und Zapfen), Horizontalzellen, Bipolarzellen, amakrine Zellen und Ganglienzellen. Die Netzhaut wird in verschiedene Schichten unterteilt (s. Abb. 1).

Funktionell läßt sich die Retina in drei Abschnitte unterteilen. Stäbchen und Zapfen bilden dabei das erste Neuron, die in der inneren Körnerschicht gelegenen bipolaren Schaltzellen werden als das zweite Neuron aufgefaßt und die in der Ganglienzellschicht angesiedelten Optikus-Ganglienzellen bilden das dritte Neuron. Die Axone der Ganglienzellen bilden den Sehnerven. Das Licht erreicht das erste Neuron also erst, nachdem es das zweite und dritte passiert hat.

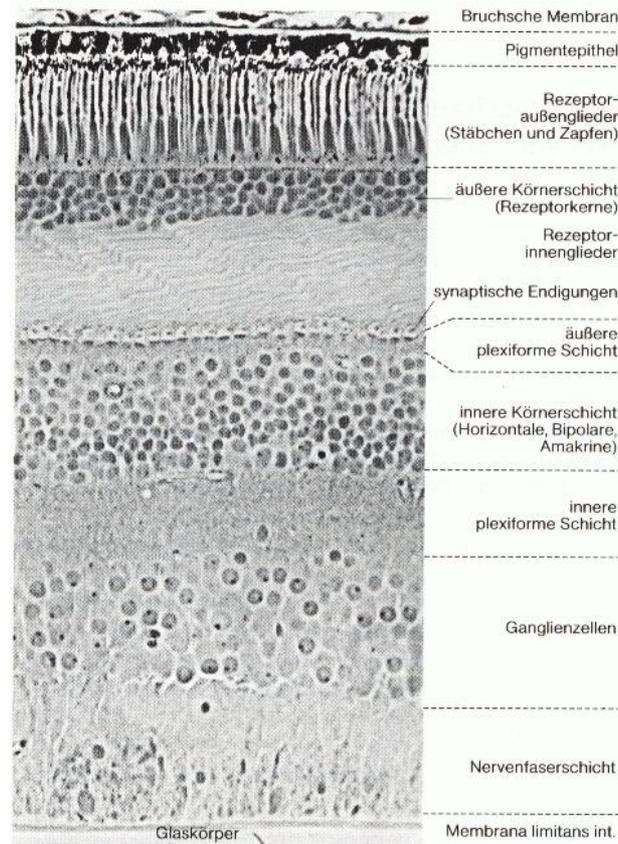


Abb. 1: Aufbau der Netzhaut

Histologisches Bild eines Querschnitts durch die menschliche Netzhaut (von Prof. B. Boycott). Einfallsrichtung des Lichts von der Glaskörperseite aus (unten). [25]

1.1.2 Photorezeptoren und retinales Pigmentepithel

Die Aufgaben der Photorezeptoren sind unterschiedlich. Die rund 110 Millionen Stäbchen liefern Hell-Dunkel-Empfindungen und ermöglichen das Sehen in der Dämmerung. Der lichtempfindliche Sehpurpur Rhodopsin wird durch Licht des gesamten sichtbaren Spektrums in seiner chemischen Konfiguration verändert: der vom Vitamin A abgeleitete Aldehyd 11 cis-Retinal wird zu 11 trans-Retinal umgelagert [32]. Die größte Stäbchendichte findet sich direkt neben der Makula sowie zur Netzhautperipherie hin.

Die 6,5 Millionen Zapfen hingegen sind für das Farbsehen zuständig. Sie finden sich insbesondere zur Makula hin. Die Makula lutea liegt etwa vier Millimeter temporal der Papille und enthält die Fovea centralis, die Stelle des schärfsten Sehens. In der Fovea centralis sind nur noch Zapfen vertreten. Beiseitegedrängte Gefäß- und

Nervenschichten ermöglichen hier ungestörten Lichteinfall sowie hohe Sehschärfe. Drei verschiedene Zapfentypen für blau, gelb und grün lassen sich unterscheiden [25].

Stäbchen und Zapfen haben einen typischen Aufbau, mit einem Außenglied, das durch ein dünnes Zilium mit dem Innenglied des Photorezeptors verbunden ist. In den Stäbchenaußengliedern liegen etwa 600 bis 1000 Membranscheibchen geldrollenförmig angeordnet. Bei den Zapfen sind die entsprechenden Strukturen Membraneinfaltungen im Außenglied [25].

Die Rezeptoraußenglieder unterliegen einer fortwährenden Erneuerung. Die Rezeptorscheibchen wandern von der Basis zur Spitze, wo sie schließlich abgestoßen werden. Die retinalen Pigmentepithelzellen phagozytieren die abgeschilferten Membranscheibchen. Dabei erfolgt die Phagozytose für die Stäbchen durch Helligkeit ausgelöst morgens, für die Zapfen bei Dunkelheit in den Abendstunden.

1.2 Erkrankungen der Netzhaut

1.2.1 *Retinitis pigmentosa*

Die Retinitis pigmentosa ist die häufigste hereditäre Netzhauterkrankung. Die Inzidenz liegt bei 1:4000 [22]. Sie führt zu Nachtblindheit und hochgradiger konzentrischer Gesichtsfeldeinschränkung. Beide Augen werden gleichermaßen betroffen. Viele dieser Patienten sind im Sinne des Gesetzes blind. Der Begriff *Retinitis pigmentosa* ist eigentlich nicht korrekt, da es sich nicht um eine Entzündung handelt, sondern um eine Netzhautdystrophie unklarer Ätiologie mit frühzeitiger Stäbchendegeneration [15].

Die Erkrankung betrifft vor allem das Pigmentepithel und die Stäbchen des Sinnesepithels in der Peripherie, dagegen erst sehr viel später die Zapfen. Das retinale Pigmentepithel weist zahlreiche unspezifische Veränderungen auf. Hier sind Atrophie, Hypertrophie, Abflachung und Desorganisation zu nennen [30]. Sekundär kommt es zu einer Degeneration der anderen Netzhautschichten, auch der Ganglienzellen, und zur Optikusatrophie. Erkrankungsalter, Progression und Grad des Sehverlustes sind meist vom Vererbungsmodus abhängig. [15].

Im späteren Verlauf der Retinitis pigmentosa entwickeln sich häufig eine Katarakt (Linsentrübung) und ein zystoides Myxödem.

Bei der Retinitis pigmentosa wird typischerweise folgende Symptomatik beobachtet: Der Betroffene merkt oft schon in der Kindheit schlechtes Sehen bei Dämmerung. Im späteren Verlauf ist er durch das konzentrisch eingeengte Gesichtsfeld behindert.

Wenn nur noch ein röhrenförmiger zentraler Gesichtsfeldrest besteht, ist ein Zurechtfinden im Raum unmöglich, auch wenn die zentrale Sehschärfe noch gut ist [15].

Es gibt verschiedene Untersuchungen zur pathogenetischen Grundlage der Retinitis pigmentosa. Inzwischen wurden mehrere Defekte im Rhodopsin-Gen gefunden. Es werden drei Hauptgruppen mit den Vererbungsmustern autosomal-dominant, autosomal-rezessiv und X-chromosomal, die unterschiedliche Phänotypen aufweisen, unterschieden [1]. Außerdem konnte in Tiermodellen für die vererbte menschliche Netzhautdystrophie Retinitis pigmentosa Apoptose in der Retina nachgewiesen werden [6].

Eine kausale Therapie ist prinzipiell nicht möglich. Der Nutzen von Vitamin A-Einnahme ist nicht gesichert. Bei sekundärer Katarakt kann dem Patienten oft mit einer Kataraktoperation geholfen werden. Sonnenbrillen mit Kantenfiltern helfen gegen Blendung, vergrößernde Sehhilfen sind wegen des Röhrengesichtsfeldes nur begrenzt hilfreich [15].

1.2.2 Morbus Sorsby

Der Morbus Sorsby bzw. die pseudoinflammatorische Makuladystrophie nach Sorsby ist eine autosomal-dominant vererbte Fundusdystrophie mit zentralem Beginn, die sich erst sehr spät, in der Regel um das 40. Lebensjahr manifestiert. Sie wurde erstmals 1949 vom englischen Ophthalmologen Arnold Sorsby beschrieben.

Bei den betroffenen Patienten besteht initial ein Makulaödem mit Blutungen und Exsudaten. Allmählich kommt es dann zu Atrophie, Pigmentierung und Sklerosierung der Aderhaut. In einem Verlauf über etwa 35 Jahre finden fortschreitende Veränderungen in der Netzhautperipherie statt, der gesamte Fundus zeigt schließlich eine ausgeprägte Aderhautatrophie mit Pigmentierung. In fortgeschrittenen Stadien leiden die Patienten unter massiver Sehbeeinträchtigung bis hin zur Erblindung [30].

Als Ursache werden eine chorioidale Neovaskularisation in Verbindung mit Einrissen in der Bruchschichten Membran sowie eine gestörte Funktion des Pigmentepithels angeschuldigt [7]. Neuere Untersuchungen von Patienten-Familien, die an der hereditären Sorsby'schen Makuladystrophie leiden, konnten verschiedene Mutationen im TIMP-3-Gen (tissue-derived inhibitor of metalloproteinases) nachweisen [54;55].

Es steht keine kausale Therapie des Morbus Sorsby zur Verfügung.

1.2.3 Altersabhängige Makuladegeneration (AMD)

Die altersbezogene Makuladegeneration ist die häufigste Erblindungsursache im Sinne des Gesetzes jenseits des 65. Lebensjahres [15].

Es wird zwischen zwei Formen der altersabhängigen Makula-Degeneration unterschieden, der atrophischen „trockenen“ Form und der exsudativen „feuchten“ Form. Bei der trockenen Form findet sich eine umschriebene, scharf begrenzte Atrophie des retinalen Pigmentepithels und der sensorischen Netzhaut. Bei der feuchten Form steht eine Neovaskularisation unterhalb des Pigmentepithels mit der Gefahr von Einblutungen und anschließender Bildung einer fibrovaskulären Membran im Vordergrund [15]. Ein Übergang von der trockenen Form ins Stadium der feuchten Makula-Degeneration ist möglich, wenn Flüssigkeit in den Raum unter das atrophische Pigmentepithel eindringt und durch die entstehenden Lücken chorioidale Gefäßschlingen eindringen [7].

Bei beiden Formen wird der Patient durch eine stark herabgesetzte zentrale Sehschärfe beeinträchtigt, so daß Lesen oder das Erkennen von Gesichtern nicht mehr möglich sind.

Die altersabhängige Makula-Degeneration besteht in einer degenerativen Zerstörung des Netzhautzentrums. Sie tritt in Folge der Überlastung des retinalen Pigmentepithels durch Alterungsvorgänge auf. Sind die Pigmentepithelzellen nicht mehr zum Abbau der abgestoßenen Rezeptoraußenglieder in der Lage, so gehen sie zugrunde [15]. In Autopsieaugen von Patienten mit AMD wurde Apoptose im Pigmentepithel beobachtet und als pathogenetischer Mechanismus postuliert [12].

Nur bei einem kleinen Anteil des Patientengutes ist eine therapeutische Photokoagulation der eingewachsenen Gefäßschlingen möglich. Andere Therapieansätze haben sich bisher nicht als wirksam erwiesen. So bleiben dem Patienten lediglich vergrößernde Sehhilfen.

1.3 Das Interferonsystem

Die Existenz vom Körper selbst gebildeter antiviraler Substanzen wurde bereits längere Zeit vor der Entdeckung der Interferone durch Lindemann und Isaacs im Jahre 1957 vermutet, aufgrund der Beobachtung, daß Patienten, die bereits eine Viruserkrankung haben, sich nicht gleichzeitig eine zweite zuziehen können.

Heute weiß man, daß humanes Interferon ein aus 166 Aminosäuren bestehendes Glykoprotein ist, das von Leukozyten (Interferon α), Fibroblasten (Interferon β) und

Lymphozyten (Interferon γ) gebildet werden kann und antivirale, antiproliferative und immunregulatorische Effekte entfaltet. Das menschliche Genom enthält mehrere Gene für Interferon α und Interferon β und ein Gen für Interferon γ . Interferon α und Interferon β werden zur Klasse Interferon Typ I zusammengefaßt, Interferon γ zählt zum Interferon Typ II. Die beiden Interferon Typen unterscheiden sich in Struktur und Rezeptor.

Interferone werden von den meisten, wahrscheinlich sogar von allen Vertebraten synthetisiert. Die Bildung erfolgt nicht spontan, sondern auf unterschiedliche Reize hin; hierzu zählen nahezu alle infektiösen und inaktivierten RNA- und DNA-Viren sowie sämtliche natürlich vorkommenden doppelsträngigen Nukleinsäuren. Die antivirale Wirkung der Interferone besteht allerdings nicht in einer direkten Hemmung der Virusvermehrung, sondern in einer Induktion eines antiviralen Status in noch nicht infizierten Zellen.

Nach Virusbefall einer Zelle wird eine spezifische mRNA gebildet, mit deren Hilfe die Zelle Interferon synthetisiert. Dieses gelangt aus der Zelle, kann durch rezeptorvermittelte Endozytose von nicht infizierten Zellen aufgenommen werden und vermag hier sowohl die Transkription viraler Nukleinsäuren als auch deren Translation in virale Proteine zu inhibieren, so daß die Zelle gegen Befall mit dem Virus resistent wird [5].

Die Signalübertragung läuft nicht über sekundäre Botenstoffe. Statt dessen werden die sogenannten Janus-Kinasen aktiviert. Diese Tyrosinkinasen übertragen auf sogenannte stat-Proteine (signal transducer and activator of transcription) im Zytoplasma Phosphatgruppen. Die phosphorylierten stat-Proteine lagern sich gemeinsam mit anderen Proteinen an eine Konsensussequenz im 5'-Bereich interferonstimulierter Gene an und fördern so die Transkription der durch Interferon regulierbaren Gene [8].

Interferon ist nicht spezifisch für einen bestimmten Virus, wirkt jedoch nur in Individuen einer Art (Artspezifität). Neben der Abwehr viraler Erkrankungen haben Interferone auch Bedeutung im Bereich von Zellwachstums und -differenzierung normaler wie Tumorzellen [38] und im Bereich der Immunregulation [27].

Seit es möglich ist, Interferone auch künstlich zu synthetisieren, werden sie erfolgreich in der Therapie von Virusinfektionen wie Hepatitis B sowie in der Behandlung von Tumoren eingesetzt.

1.4 Die Apoptose

Das Wort Apoptose leitet sich von dem griechischen Begriff Apoptosis (αποπτωση) ab, der den Fall welcher Blätter von herbstlichen Bäumen beschreibt. In der Zellbiologie meint Apoptose das gezielte Zugrundegehen einer Zelle im Rahmen ihrer Differenzierung während der Embryonalentwicklung, aber auch im erwachsenen Organismus, wo ein Gleichgewicht zwischen der Neubildung von Zellen und deren planmäßigem Verlust besteht. Ist dieses Gleichgewicht gestört, so kann es zum Beispiel zu Tumorerkrankungen oder Autoimmunerkrankungen aufgrund des Überlebens eigentlich zum Tode bestimmter Zellen kommen, andererseits gilt Apoptose an falschen Stellen als Ursache für neurodegenerative Erkrankungen [26]. Die Apoptose ist nicht nur im Bereich der Entwicklung von Geweben von Bedeutung, sondern spielt auch in der Immunabwehr bei der Attacke der betreffenden Zelle durch zytotoxische T-Lymphozyten eine wichtige Rolle; des weiteren stellt die Fähigkeit des Tumorsuppressors p53, die Apoptose zu aktivieren, einen wichtigen Verteidigungsmechanismus gegen Krebs dar. Im Gegensatz zur Apoptose steht der unregelmäßige nekrotische Zelltod, der den Untergang größerer Gewebesareale nach sich zieht.

Der „Selbstmord“ der Zelle ist ein aktiver Prozeß und läuft nach einem genetisch kontrollierten Programm ab, das in vier Phasen unterteilt werden kann: Die Induktionsphase, die Effektorphase, die Degradationsphase und die Phagozytose [28]. Die Zelle wird kompakter, in der Membran bilden sich Blasen, das Chromatin verdichtet sich, und die DNA zerfällt. Zum Schluß zerfallen die toten Zellen in membrangebundene Stücke und werden von den umliegenden Zellen resorbiert [31]. Ein wichtiges Erkennungsmerkmal für Phagozyten scheint die Expression von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche zu sein [56].

Die Komponenten, die zur Apoptose führen, können in vielen, vielleicht sogar allen eukaryotischen Zellen vorhanden sein. Es gibt verschiedene Faktoren, die den auch als programmierten Zelltod bezeichneten Vorgang auslösen können. Hierzu zählen beispielsweise der Entzug essentieller Wachstumsfaktoren, eine Glucocorticoid-Therapie, γ -Strahlen sowie die Aktivierung spezifischer Rezeptoren. Die Vielzahl der Stimuli, die zell- und gewebespezifische Signale aktivieren können, wird als „private pathway“ der Apoptose bezeichnet [42]. Kontrolliert wird die Apoptose sowohl durch Faktoren, die den Weg blockieren als auch durch solche, die ihn aktivieren. Eine der üblichen Reaktionen führt über die Protease Apopain, die zur Familie der ICE-Proteasen gehört und für den programmierten Zelltod erforderlich ist. Ebenfalls zu

dieser Familie wird eine Cysteinprotease gerechnet, die den pro-IL-1 β -Vorläufer durch Spaltung aktiviert. Möglicherweise sind noch andere Mitglieder der ICE-Proteasen an der Auslösung der Apoptose beteiligt, es existiert eine regelrechte Kaskade, bei der sich die Mitglieder nacheinander durch gegenseitige Spaltung aktivieren [31]. Dem bcl2-Gen wird bislang ein antiapoptotischer Effekt zugeschrieben [41], seine spezielle Funktion im Zusammenhang mit der retinalen Apoptose ist jedoch noch unklar.

1.5 Matrix Metalloproteinasen und ihre Inhibitoren

Der Erhalt des Gleichgewichtes zwischen Erneuerung und Degradation der extrazellulären Matrix ist für eine normale Gewebsentwicklung und für die Beseitigung von Gewebsschäden durch Wunden oder Entzündung notwendig [40]. Matrix Metalloproteinasen (MMPs) nehmen eine Schlüsselrolle bei der Degradation der extrazellulären Matrix ein. MMPs sind Zink-Endopeptidasen, die Proteoglykane, Glykoproteine und Kollagene spalten. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Wundheilung und bei physiologischen Vorgängen wie Embryogenese, Angiogenese und Organmorphogenese [4]. Vermutlich sind sie aber auch bei pathologischen Vorgängen wie der Entwicklung und Progression von Krebserkrankungen beteiligt [35]. Die MMPs können in drei Untergruppen eingeteilt werden: interstitielle Collagenasen, Typ IV Collagenasen (Gelatinasen) und Mitglieder der Stromelysin (Transin) Gruppe [35]. Die verschiedenen Mitglieder der MMP-Familie enthalten bestimmte hoch konservierte Domänen. Trotz dieses hohen Ähnlichkeitsgrades unterscheiden sich die MMPs hinsichtlich Substratspezifität und Antwort auf extrazelluläre Stimuli, was darauf schließen läßt, daß jedes Mitglied der MMP-Familie eine festgelegte Funktion in physiologischen wie pathologischen Prozessen hat [14]. Für die Metalloproteinasen Collagenase, Gelatinase und Stromelysin konnte gezeigt werden, daß sie zum Untergang der extrazellulären Matrix beitragen [47]. Collagenase spaltet Kollagen Typ I, II, III und X [18], Stromelysin zeigt Aktivität gegen Fibronectin, Laminin, Kollagen Typ IV und Proteoglykane [37]. Die MMPs werden als Zymogene sezerniert und durch die Spaltung eines Propeptides aktiviert [44].

Die Einflußfaktoren, die die Produktion der MMPs regulieren, sind zum Teil schon recht genau untersucht. Für Collagenase und Stromelysin konnte gezeigt werden, daß sie durch den Tumorpromoter 12-o-tetradecanoyl-phorbol- 13-acetat und durch UV- Bestrahlung reguliert werden, während cAMP keinen Einfluß auf ihre Produktion hat

[14]. Für die Matrix Metalloproteinase-3, Stromelysin, ist bekannt, daß sie sowohl positiv als auch negativ durch eine Vielzahl biologisch aktiver Moleküle auf Transkriptionsebene reguliert wird, hierzu zählen Wachstumsfaktoren, Onkogene, Zytokine und Steroide [13]. Außerdem konnte gezeigt werden, daß die Stromelysin-mRNA durch Interleukin 1- β induziert werden kann, und daß die induzierten mRNA-Level durch Vitamin A-Säure und Dexamethason supprimiert werden können [46].

Die Regulation der MMPs findet auf unterschiedlichen Stufen statt: Gentranskription, Proenzymaktivierung und Inhibierung durch sogenannte TIMPs, tissue-derived inhibitors of metalloproteinases [51]. Bis heute sind vier Mitglieder der TIMP-Familie bekannt. Sie binden an Metalloproteinasen und inaktivieren deren proteolytische Aktivität [2]. TIMP-1 inhibiert die meisten MMPs und hat einen mitogenen Effekt auf normale und neoplastische Zelllinien. TIMP-2 ist spezifisch für Gelatinase A, inhibiert aber vermutlich auch andere MMPs. Die Spezifität von TIMP-3 und TIMP-4 ist noch nicht bekannt [19].

Der zeitliche Verlauf der Protease-Induktion geschieht in den meisten Zelltypen innerhalb einer Zeitspanne von 18 bis 24 Stunden, weswegen die MMPs zu den Produkten „später Gene“ gerechnet werden. Ihre Induktion hängt von der Aktion mittelfristiger und früher Gene wie zum Beispiel Transkriptionsfaktoren ab [3]. Zu den Transkriptionsfaktoren, die zumindest in manchen Systemen zum apoptotischen Zelltod beitragen, zählt unter anderem der Transkriptionsfaktor AP-1, der sich aus den Proto-Onkogenen c-fos und c-jun sowie anderen Mitgliedern dieser Proteinfamilie zusammensetzt [42]. Die Gene, die in der Retina an der Auslösung von Apoptose beteiligt sind, sind noch nicht hinreichend bekannt, allerdings könnte auch hier der Transkriptionsfaktor AP-1 eine Vermittlerstelle einnehmen. Unter Zellkulturbedingungen konnte für menschliche Zellen gezeigt werden, daß die MMP Collagenase über den Transkriptionsfaktor AP-1 reguliert wird [14]. Auch in der Promotersequenz des Ratten Stromelysin konnte eine AP-1-Bindungsstelle identifiziert werden [35] und die Bedeutung dieses Transkriptionsfaktors bei der Regulation von Stromelysin gezeigt werden.

2 THEMENSTELLUNG

Ophtalmologische Krankheitsbilder wie die altersabhängige Makuladegeneration, der Morbus Sorsby und die Retinitis pigmentosa sind Erkrankungen, die durch Degeneration der Netzhaut zu einer deutlichen Sehbehinderung, in vielen Fällen bis zur Erblindung führen können. Da über die genaue Pathogenese bisher jedoch nur unvollständige Erkenntnisse gewonnen werden konnten, sind weder eine erfolgreiche Prävention noch eine kausale Therapie möglich. Es konnte jedoch bereits gezeigt werden, daß diesen und ähnlichen Erkrankungen ein gemeinsamer Mechanismus zugrunde liegt: Die Degeneration der Netzhaut erfolgt durch einen programmierten Zelltod, die sogenannte Apoptose, eine Art des Zelltodes, die in zahlreichen biologischen Prozessen eine entscheidende Rolle spielt [39].

Das genaue Wissen über die molekulargenetischen Zusammenhänge, die in den Zellen der menschlichen Netzhaut zur Apoptose führen, könnte einen wesentlichen Beitrag zur Entwicklung neuer Therapieansätze leisten.

Neben zahlreichen anderen zellulären Defekten wird als ein möglicher Auslöser für die retinale Apoptose eine Störung in der Phagozytoseaktivität der retinalen Pigmentepithelzellen vermutet. Der genaue Weg, auf dem diese Störung zum Zelltod führt, ist jedoch unbekannt.

Eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit der Aufrechterhaltung einer intakten extrazellulären Matrix wird den Metalloproteinasen, wie Collagenase und Stromelysin, sowie ihren Inhibitoren, der TIMP-Familie zugeschrieben. In der Netzhaut initiieren Metalloproteinasen die Degeneration der extrazellulären Matrix und können dadurch eine entzündliche Reaktion sowie die durch Apoptose bedingte Atrophie des Pigmentepithels bedingen.

Eine zentrale Rolle bei diesen Regulierungsvorgängen scheint neben zahlreichen anderen Transkriptionsfaktoren der Transkriptionsfaktor AP-1 (activator protein-1) einzunehmen. Die Genexpression von Stromelysin, einer Metalloprotease, die in der Niere, der Lunge und dem Gehirn vorkommt, wird durch Transkriptionsfaktoren des AP-1-Komplexes vermittelt, ebenso könnte deren Inhibitor TIMP-3 durch AP-1 reguliert werden [29] Es werden jedoch sowohl AP-1-abhängige als auch -unabhängige Wege beschrieben. AP-1 scheint eine molekulare Vermittlerstelle im Vorgang des Zelltodes einzunehmen.

Um genauere Einblicke in die Pathogenese von Degenerationen und Dystrophien der menschlichen Netzhaut zu gewinnen, entstand das gemeinsame Forschungsunternehmen der Arbeitsgruppe um Frau Prof. Dr. Remé, Labor für Zellbiologie der Universitäts-Augenklinik Zürich und der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. Jungwirth, Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg. Aufgabengebiet der Würzburger Arbeitsgruppe ist die Untersuchung der Regulation der Expression von verschiedenen Apoptose-Genen sowie der Regulation der Genexpression verschiedener Metalloproteinasen, insbesondere Collagenase und Stromelysin sowie von TIMP-3 in Pigmentepithelzellen in Kultur.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Frage, ob in der retinalen Pigmentepithelzelllinie ARPE-19 die Matrix Metalloproteinasen Collagenase und Stromelysin exprimiert werden und ob ihre Genexpression durch humane Interferone Typ I beziehungsweise Typ II stimuliert werden kann. Untersucht wird die Genexpression auf mRNA-Ebene anhand der Northern blot-Analyse und mit der RT-PCR-Methode. Als Kontrolle dienen humane Fibroblasten sowie eine humane Gliomazelllinie, in denen die genetische Information der Metalloproteinasen Collagenase und Stromelysin bereits nachgewiesen werden konnte [40; 53].

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Methoden

3.1.1 Führen einer Zellkultur

Die Versuche werden mit retinalen Pigmentepithelzellen durchgeführt. Für die Zellkultur wird ein Nährmedium verwendet, das aus MEM und 10 % fötalem Kälberserum besteht. Auf 1 l Nährmedium werden 10 ml NaHCO₃ sowie 2x 10⁵ Einheiten Antibiotikum (Streptomycin und Penicillin) gegeben.

Die Zellkultur wird regelmäßig unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Sind die Zellen konfluent, so werden sie umgesetzt. Hierzu gießt man das verbrauchte Medium ab, wäscht die Zellen zweimal mit 37° C warmem ATV und läßt ein kleines Volumen ATV bei 37° C etwa 5 min lang auf die Zellen einwirken, um sie von der Unterfläche der Zellkulturflasche abzulösen. Die Zellen werden in auf 37° C vorgewärmtem frischem Nährmedium suspendiert und zu gleichen Teilen auf zwei oder drei neue Zellkulturflaschen aufgeteilt. Die Flaschen werden je nach Größe mit Nährmedium auf ein definiertes Volumen aufgefüllt und bei 37° C im Brutschrank aufbewahrt.

Die humanen Fibroblasten sowie die Gliomazellen werden in gleicher Weise versorgt, als Nährmedium dient hier MEM und 15 % fötales Kälberserum.

3.1.2 Behandlung der Zellen mit Interferon

Für die Interferonbehandlung werden die konfluenten Zellen auf die benötigte Anzahl Petrischalen umgesetzt. Das verbrauchte Medium wird abpipettiert, und frisches Medium sowie 250 oder 500 Einheiten/ml Medium Interferon in die Petrischale gegeben (Angaben für Petrischalen mit 10 cm Durchmesser). Diese wird für einen zuvor festgelegten Zeitraum im Brutschrank aufbewahrt.

3.1.3 RNA - Präparation nach der LiCl - Methode

Gewöhnlich verwendet man Petrischalen von 10 cm Durchmesser. Das Nährmedium wird abpipettiert und die Zellen werden zweimal mit 4° C kaltem PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung) und einmal mit ATV gewaschen. Dann wird 1 ml ATV in die Petrischale gegeben. Wenn die Zellen abgelöst sind, nimmt man sie erst in 4 ml und dann noch mal in 5 ml PBS auf und überführt sie in ein steriles Röhrchen. Es wird bei

2000 Upm und 4° C 5 min lang zentrifugiert, der Überstand wird abgekippt, eventuell am Rand des Röhrchens hängende Tropfen werden mit einer Pasteurpipette unter Vakuum abgesaugt und das Sediment in 0.3 ml PBS resuspendiert. Anschließend wird ein Volumen 37° C warmen Proteinase K-Puffers hinzugegeben. Zum Scheren der hochmolekularen DNA benutzt man Fertigspritzen (5 - 10 mal aufziehen), mit denen man nach dem Aufziehen das gesamte Volumen in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es werden 20 µl Proteinase K-Puffer der Konzentration 20 mg/ml hinzugegeben und das Gemisch 1 h bei 37° C stengelassen.

Anschließend werden 0.6 ml eines Phenol/Chloroform-Gemisches hinzugefügt, gut gemischt und 10 min lang bei 12000 Upm und 18° C zentrifugiert. Dadurch bilden sich drei Phasen: Die Phenolphase unten, eine Grenzschicht mit dem denaturierten Restprotein, und die wässrige Phase mit der RNA oben. Eventuell muß die organische Phase mit 4 ml PBS reextrahiert werden. Die wässrige Phase wird in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt, und die RNA mit 1 Volumen 4 molarem LiCl der Temperatur 4° C gefällt. Nach der Fällung wird 15 min bei 10000 Upm und 4° C zentrifugiert. Um das Salz zu lösen, wäscht man das Sediment einmal mit 70 %igem Ethanol und trocknet es 5 min lang bei Zimmertemperatur. Wenn das Sediment vollständig getrocknet ist, wird es je nach Größe in 30-50 ml DEPC-Wasser gelöst.

Für die Konzentrationsbestimmung wird eine 1:100 Verdünnung in mit DEPC behandeltem Wasser hergestellt. Nachdem der Leerwert mit dem gleichen Volumen DEPC-Wasser festgelegt wurde, werden 100 µl der Verdünnung im Spektralphotometer gemessen. Durch Multiplizieren mit dem Faktor 100 erhält man die Konzentration der unverdünnten RNA in µg/ml.

Zur Kontrolle der Meßgenauigkeit des Spektralphotometers dient das Verhältnis der Meßwerte bei 260 nm und bei 280 nm. Es sollte stets unter 2.0 liegen.

3.1.4 RNA-Gelelektrophorese

Proteinionen lassen sich im elektrischen Feld in Richtung der entgegengesetzt geladenen Elektroden auftrennen. Die Wanderungsrichtung wird durch die positive oder negative Ladung der Teilchen festgelegt; Anionen wandern zur Anode, Kationen zur Kathode. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt von der Anzahl der elektrischen Ladungen und der Größe der Teilchen ab. Mit der Hochspannungselektrophorese ist auch die Trennung von Gemischen kleinerer Moleküle, wie zum Beispiel Nukleinsäuren, möglich.

Es wird folgendermaßen vorgegangen: Für ein 1 %iges RNA-Gel werden 0.34 g Agarose in 28.6 ml DEPC-Wasser aufgekocht. Nach Abkühlen auf Handwärme gibt man 3.4 ml 10x MOPS-Puffer, 2 ml Formaldehyd und 1µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zu, mischt und gießt die Lösung in eine Mini-gelkammer. Ein Kamm wird mit Wasserstoffperoxid gereinigt, mit destilliertem Wasser abgespült und in die flüssige Agarose getaucht. Nach Erstarren des Gels wird dieses mit 1x MOPS überschichtet und der Kamm herausgezogen. 3 µg der RNA-Präparation werden mit 3-fachem Volumen RNA-Denaturierungs-Puffer versetzt, 15-20 min bei 65° C im Heizblock denaturiert und auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 10x Gelprobenpuffer (10 % der Gesamtmenge) werden die RNA-Proben zusammen mit einem Marker auf das Gel aufgetragen. Die RNA wird 3 h bei 35 mA aufgetrennt und das Gel im UV-Licht fotografiert.

3.1.5 Northern blot-Methode

Die Northern blot-Methode ist ein Verfahren der Gentechnologie, bei dem RNA nach elektrophoretischer Auftrennung auf flexible Membranen übertragen und immobilisiert wird; anschließend kann die RNA mit einer Sonde hybridisiert werden.

Um optimale Bedingungen für das Blotting zu schaffen, sollten folgende Punkte beachtet werden: Für den Transfer der RNA vom Agarosegel auf eine Nylonmembran werden Salzkonzentrationen von 20x SSC verwendet. Die optimale Dauer ist über Nacht, jedoch mindestens 5 h bei Zimmertemperatur. Beim Umgang mit der Membran müssen stets Handschuhe getragen werden, und die Membran sollte nur mit Hilfe von Pinzetten an den Rändern angefaßt werden. Zunächst muß die Nylonmembran im 20x SSC-Puffer equilibriert werden. Um eine gleichmäßige Befeuchtung der Membran zu erreichen, wird sie kurz in DEPC-Wasser getaucht, bevor sie in eine Petrischale mit Puffer gelegt wird. Auch sämtliches verwendetes Whatman-Papier wird mit Puffer befeuchtet.

Der Versuchsaufbau erfolgt folgendermaßen: Zuunterst befindet sich eine Petrischale mit 20x SSC-Puffer. Eine Glasplatte wird als „Brücke“ quer darüber gelegt, so daß die Enden des auf der Glasplatte liegenden Whatman-Papiers in den Puffer eintauchen. Auf dem Whatman-Papier liegt das zu blottende Gel, das an den Rändern mit Parafilm abgedeckt wird, damit die RNA nicht seitlich vorbei diffundieren kann. Aus einer Nylonmembran wird ein Rechteck in Größe des Gels ausgeschnitten und so auf das

Gel gelegt, daß sich zwischen Gel und Membran keine Luftblasen befinden. Es folgen drei Lagen Whatman-Filterpapier und darauf ein Stapel Papier zur Erzeugung der Kapillarwirkung. Zuerst liegt ein Gewicht von etwa 300 g.

Der Blot wird über Nacht stehengelassen. Durch Betrachten von Gel und Membran im UV-Licht kann festgestellt werden, ob der Versuch gelungen ist und sich die RNA jetzt auf der Membran befindet. Ist dies der Fall, so wird die RNA durch Einbrennen auf der Membran fixiert. Hierzu wird sie für 30 min bei 120° C im vorgeheizten Backofen im Vakuum gebacken. Aufbewahren läßt sich die Membran am besten luftdicht eingeschweißt im Kühlschrank.

3.1.6 Klonierung eines DNA-Inserts in einen bekannten Vektor

Befindet sich das Insert eines zu untersuchenden Gens in einem Vektor, über dessen Eigenschaften unzureichende Informationen vorliegen, ist es günstiger, das Insert in einen bekannten Vektor umzuklonieren. Zunächst wird das Insert mit der Information des zu untersuchenden Gens aus dem vorliegenden Vektor ausgeschnitten. Zur Wahl geeigneter Enzyme vgl. Vorschrift 1.11. Der Verdau wird mit einem DNA-Marker auf ein präparatives DNA-Gel aufgetragen und nach erfolgter Auftrennung wird die Bande, die dem Insert entspricht, unter der UV-Lampe mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die DNA wird wie unter 1.13 beschrieben eluiert.

Der bekannte Vektor wird mit geeigneten Restriktionsenzymen geöffnet. Um eine Selbstligation des Vektors zu verhindern, werden die 5'-Enden mit 0.5 µl Shrimp Alkalische Phosphatase 6 h lang bei einer Temperatur von 37° C dephosphoriliert. Für den Ligationsansatz sollte das Verhältnis Vektor : Insert bei 1 : 3 liegen. DNA von Vektor sowie Insert werden mit 1.0 µl DEPC-Wasser, 1.0 µl 10x Ligase-Puffer und 0.5 µl T4 DNA Ligase zusammengegeben und 8 h bei 4° C stehen gelassen.

3.1.7 Transformation

Ein Eis/Ethanol-Bad einer Temperatur von 0° C wird vorbereitet. Die kompetenten Zellen (Bakterien des Stammes E. coli: DH 5α) werden aus dem -70° C-Gefrierschrank genommen und in Eiswasser aufgetaut. Man stellt die benötigte Anzahl autoklavierter 1.5 ml Reaktionsgefäße auf Eiswasser bereit. Die Zellen werden gut gemischt und in Aliquots von 50 µl auf die Reaktionsgefäße verteilt. Unbenötigte Zellen werden 5 min im trockenen Eis/Ethanol-Bad gefroren, bevor man sie zurück in den -70°

C-Gefrierschrank gibt. Um den Erfolg der Transformation überprüfen zu können, gibt man 5 µl Kontroll-pUC19 in ein 50 µl kompetente Zellen enthaltendes Reaktionsgefäß und mischt gründlich. In ein zweites Reaktionsgefäß mit 50 µl kompetenten Zellen gibt man 1-3 µl DNA-Ligations-Reaktion und mischt ebenfalls gut. Die Zellen werden 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 20 sec lang einer Temperatur von 37° C ausgesetzt, ohne die Reaktionsgefäße zu schütteln. Danach legt man sie 2 min lang auf Eis. 0.95 ml LB-Medium mit Raumtemperatur werden hinzugegeben und das Gemisch 1 h lang bei 225 Upm und einer Temperatur von 37° C geschüttelt. 0.1 ml der die pUC19-Kontroll-Zellen enthaltenden Reaktion werden in 0.9 ml Medium gelöst und 100 µl der unverdünnten Lösung sowie die 1:10 Verdünnung auf LB-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin und 50 µg/ml X-Gal oder Bluo-Gal ausgestrichen. Falls die Zellen konzentriert werden müssen, werden sie 5 sec in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert und in 100 µl Medium resuspendiert. 90, 10 und 1 µl werden ausgestrichen. Zu den 10 µl- und 1 µl-Aliquots werden jeweils 100 µl Medium hinzugegeben. Es wird über Nacht bei 37° C inkubiert.

3.1.8 Mini-Präparation

Vor der aufwendigeren Plasmid-Präparation wird das Ergebnis der Transformation zunächst durch eine sogenannte Mini-Präparation überprüft.

Hierzu werden 1.5 ml Bakterienkultur 3 min lang bei 12000 Upm und Raumtemperatur zentrifugiert, das Sediment in 100 µl TNE suspendiert und mit 100 µl Phenol/Chloroform extrahiert. Es wird 5 min bei 12000 Upm und Raumtemperatur zentrifugiert, die wässrige Phase abgenommen und nacheinander 0.2 Volumen 10 M Ammoniumacetat und 2 Volumen 100 %iger Ethanol hinzugegeben. Der Ansatz wird 15 min auf Eis gelagert und 10 min bei 12000 Upm und einer Temperatur von 4° C zentrifugiert. Das Sediment ist mit 70 %igem Ethanol zu waschen, zu trocknen und in 50 µl TE+RNase aufzunehmen.

Anschließend wird ein Probeverlauf wie unter III.1.11 beschrieben durchgeführt und das Ergebnis anhand einer Gelelektrophorese überprüft.

3.1.9 Anzucht von Bakterien für die Plasmid-Präparation

Die Bakterien, die die genetische Information des zu untersuchenden Gens auf einem Plasmid tragen, werden in 1x LB-Medium angezüchtet.

25 ml 1x LB-Medium werden mit 2 Platinösen Bakterien beimpft. Es wird Ampicillin in einer 1:1000 Verdünnung hinzugegeben und bei 180 Upm und einer Temperatur von 37° C geschüttelt. Erscheint das Medium trüb (nach etwa 5 h), so wird es in einen großen Kolben umgefüllt und mit 500 ml 1x LB-Medium aufgefüllt. Bei gleicher Temperatur und Frequenz werden die Bakterien zur Vermehrung über Nacht in den Schüttler gestellt.

3.1.10 Plasmid-Präparation

Die Plasmid-Präparation gliedert sich in drei Arbeitsschritte: Ernte und Lyse der Bakterien sowie Reinigung der Plasmid-DNA.

Für die Ernte wird eine 500 ml Kultur der Bakterien zunächst bei 4000 Upm und einer Temperatur von 4° C 15 min lang in einem Sorvall GS3 Rotor zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und die Zentrifugenflasche umgekehrt aufgestellt, um alle Flüssigkeit zu entleeren. Das die Bakterien enthaltende Sediment wird in 100 ml eiskaltem STE resuspendiert. Es wird erneut wie oben zentrifugiert.

Es folgt die Lyse der Bakterien. Hierfür wird wieder der Überstand abgegossen und die Flasche kurz umgestülpt. Das Bakterien-Sediment wird in 18 ml Lösung 1 resuspendiert. Nacheinander werden 2 ml frisch hergestellten Lysozyms einer Konzentration von 10 mg/ml in 10mM Tris-HCl (pH 8.0) und 40 ml ebenfalls frisch angesetzter Lösung 2 hinzugegeben. Die Flasche wird geschlossen und der Inhalt durch mehrmaliges Umdrehen der Flasche gründlich gemischt. Nach 5 bis 10 min Stehen der Flasche bei Raumtemperatur gibt man 20 ml eiskalter Lösung 3 hinzu. Es muß wieder gut geschüttelt werden, bis keine verschiedenen Phasen mehr sichtbar sind. Die Flasche wird 10 min lang auf Eis stehengelassen. Ein weißes Präzipitat sollte ausflocken. Es enthält chromosomale DNA, hochmolekulare RNA und Komplexe aus Kalium, SDS, Protein und Membran.

Das Bakterien-Lysat wird 15 min bei 4000 Upm und einer Temperatur von 4° C in einem Sorvall GS3-Rotor zentrifugiert und der entstandene Überstand, der die Nukleinsäuren enthält, durch vier Lagen eines Faltenfilters in eine 250 ml Zentrifugenflasche gefiltert. 0.6 Volumenprozent Isopropanol werden hinzugegeben, gut gemischt und die Flasche 10 min lang bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach Zentrifugation bei 5000 Upm für 15 min bei Raumtemperatur wird der Überstand sorgfältig abgenommen, die Flasche wieder zum Austrocknen umgestülpt und das

Sediment bei Raumtemperatur mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Das Ethanol wird abpipettiert und letzte Tropfen an der Wand der Flasche mit einer Vakuum-Pipette abgesaugt. Wenn das Sediment vollständig getrocknet ist, wird es in 3 ml TE gelöst.

Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgt durch Präzipitation mit Polyethylen-Glykol.

Die die Nukleinsäuren enthaltende Lösung wird in eine 15 ml Corex-Flasche überführt und 3 ml eiskaltes 5 M LiCl werden hinzugegeben, um die hoch-molekulare RNA auszufällen. Nach gründlichem Mischen wird die Lösung 10 min lang bei 10000 Upm und einer Temperatur von 4° C zentrifugiert. Der Überstand wird in eine frische 30 ml Corex-Flasche überführt. Nach Zugabe eines Volumens Isopropanol wird gut gemischt und 10 min lang bei 10000 Upm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand ist sorgfältig abzunehmen, die Flasche kurz umzustülpen und das Sediment mit 70 %igem Ethanol zu waschen. Wenn das Sediment getrocknet ist, wird es in 500 µl TE mit einer DNase-freien Pankreas-RNase in einer Konzentration von 20 µg/ml gelöst, die Lösung wird in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und muß 30 min bei Zimmertemperatur stehen. Dann gibt man 500 µl 1.6M NaCl mit 13 % (w/v) Polyethylen-Glykol hinzu, mischt gründlich und zentrifugiert die Lösung 5 min lang bei 12000 Upm und einer Temperatur von 4° C. Der Überstand ist abzunehmen und das Sediment mit der Plasmid-DNA in 400 µl TE zu lösen. Die Lösung wird nacheinander mit Phenol, einem Phenol-Chloroform-Gemisch und mit Chloroform extrahiert. Die flüssige Phase wird in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, man gibt 100 µl 10M Kalium-Acetat hinzu und mischt gründlich. Nach Zugabe von 2 Volumen 100 %igem Ethanol läßt man das Reaktionsgefäß 10 min bei Raumtemperatur stehen und zentrifugiert dann 5 min lang bei 12000 Upm und einer Temperatur von 4° C. Der Überstand wird abpipettiert und 200 µl 70 %iges Ethanol hinzugegeben. Nach kurzem, gründlichen Mischen wird 2 min lang unter den gleichen Bedingungen wie zuvor zentrifugiert, der Überstand wird abgenommen und das Sediment in 500 µl TE gelöst.

Die Konzentration der erhaltenen DNA wird im Spektralphotometer gemessen und die aliquotierte DNA bei -20° C gelagert.

3.1.11 Enzymatische Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Vor der weiteren Bearbeitung der präparierten DNA wird ein Linearisierungsverdau durchgeführt, mit dem überprüft wird, ob die DNA in Ordnung ist. Zusätzlich kann ein

Verdau durchgeführt werden, bei dem genau das Insert herausgeschnitten wird, um sicherzustellen, daß die präparierte DNA das gewünschte Plasmid enthält.

Zunächst müssen ein bzw. zwei geeignete Enzyme und dazu passende Puffer ausgewählt werden. Hierzu benötigt man die Restriktionskarte des Plasmids. Für den Linearisierungsverdau wählt man ein Enzym, das nur eine Schnittstelle im Plasmid besitzt. Erwartungsgemäß erhält man somit in der nachfolgenden Gelelektrophorese eine scharfe Bande definierter Länge. Für den zweiten Verdau wählt man zwei Enzyme, die ebenfalls jeweils nur einmal im Plasmid schneiden und zwar nahe den Einsatzstellen des Inserts, und deren Hauptaktivität nach Möglichkeit im gleichen Puffer liegt. In der Gel-elektrophorese erwartet man dann zwei scharfe Banden definierter Länge, eine mit Größe des Vektors, in den das Insert kloniert wurde, und eine mit Größe des Inserts, das die genetische Information des jeweils zu untersuchenden Gens trägt.

Die Zusammensetzung des Restriktionsverdaus bestimmt man folgendermaßen: Die Menge der eingesetzten DNA richtet sich nach der Anzahl der erwarteten Banden. Es sollten nicht mehr als 200 ng DNA pro erwarteter Bande aufgetragen werden, da das Ergebnis sonst schlecht zu beurteilen ist. Pro 1 µg eingesetzter DNA benötigt man 3 Einheiten Enzym. Die Enzymmenge sollte wegen ihres Glyceringehaltes nicht mehr als 10 % des Endvolumens betragen. Vom 10x Puffer werden ebenfalls 10 % des Gesamtvolumens eingesetzt. Der Ansatz wird mit sterilem Wasser auf ein Endvolumen aufgefüllt, gründlich gemischt, kurz zentrifugiert und 2 h bei 37° C inkubiert.

Das Ergebnis des Probeverdaus wird mit einer Gelelektrophorese überprüft.

3.1.12 DNA-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgt in einem 1 %igen Agarosegel. Es werden Minigele verwendet. Hierfür werden 30 ml 0.5x TBE-Puffer mit 0.3 g Agarose aufgeköcht. Nach Abkühlen auf 50° C gibt man 1 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) hinzu. Die flüssige Agaroselösung wird in eine Gelplatte gegossen und ein Kamm für die Probenaschen hinzugefügt, so daß er sich etwa einen Millimeter über der Plattenoberfläche befindet. Sobald das Gel erstarrt ist, wird es in eine kleine Gelkammer eingesetzt, diese mit 300 ml 0.5x TBE-Puffer gefüllt und der Kamm entfernt. 2 µl DNA-Probe mischt man mit 8 µl TE-Puffer, gibt 2 µl Gelladepuffer hinzu und gibt das Gemisch in eine Probenasche. Man läßt das Gel bei 80 Volt etwa 2 h lang laufen. Anschließend entfernt man das Gel aus der Kammer und fotografiert es im UV-Licht.

3.1.13 Präparatives DNA-Gel und Elektroelution

Das präparative DNA-Gel mit anschließender Elektroelution kann zur Abtrennung bestimmter DNA-Banden vom Rest der aufs Gel aufgetragenen DNA verwendet werden, zum Beispiel im Rahmen der Umklonierung eines Inserts in einen anderen Vektor, oder um nicht vollständig linearisierte DNA vom unverdauten Rest abzutrennen.

Das Prinzip der Elektroelution funktioniert folgendermaßen: Die „StrataEluter“-Vorrichtung besteht aus einem Tablett in der Mitte des Gehäuses, in dem sich sechs Öffnungen für Patronen befinden, die, wenn sie nicht alle benötigt werden, mit einem Pfropfen verschlossen werden können. Die Patronen werden mit Versteifungsringen in ihrer Position im Tablett gehalten. In die Patrone wird das Gelstückchen gegeben. Am Ende der Patrone befindet sich ein kleiner Auffangbehälter aus Acryl, der eine semipermeable Membran zur Filterung von Molekülen unter einem Molekulargewicht von 5000 enthält. Innerhalb der Patronen befindet sich eine sogenannte Fritte, eine poröse Scheibe aus Polyethylen, die es der eluierten DNA erlaubt, in den Auffangbehälter zu fließen, und gleichzeitig das Agarosegel zurückhält. Die Elution erfolgt durch Elektrophorese. An der Oberseite des Gehäuses befindet sich der Minus-, an der Unterseite der Pluspol. Die Dauer der Elektroelution richtet sich nach der Dauer der vorangegangenen Gelelektrophorese.

Es wird folgendermaßen vorgegangen: Man trennt eine möglichst große Menge DNA (empfohlene Menge: 72 µg) auf einem Agarosegel mit Ethidiumbromid auf. Im UV-Licht wird mit einer Rasierklinge oder einem Skalpell die zu isolierende Bande ausgeschnitten. Das Gelstückchen mit der zu eluierenden DNA kann 24 bis 36 h ohne Puffer bei einer Temperatur von 4° C aufbewahrt werden.

Beim Umgang mit den Membran-Näpfen sollten stets Handschuhe getragen werden. Die Näpfe müssen 10 bis 15 min vor dem Zusammenstecken mit den Patronen sorgfältig mit Elektrophorese-Puffer angefeuchtet und auf eine saubere Arbeitsfläche gestellt werden. Die Patronen und Fritten sind vor dem Zusammenstecken gründlich mit Puffer abzuspülen. In den Fritten dürfen sich keine Luftblasen befinden.

Das untere Reservoir der Versuchsvorrichtung wird zu einem Drittel mit Puffer gefüllt, so daß die Auffangbehälter mit den Membranen und die Elektroden bedeckt sind. Dann werden die Patronen in die Versteifungsringe eingesetzt. Der mit Puffer gefüllte Membran-Napf wird in einem kleinen Winkel von unten an die Patrone angenähert, so

daß Luft seitlich entweichen kann, um Luftblasen zwischen Patrone und Auffangbehälter zu vermeiden. Beim Zusammenstecken von Patrone und Auffangbehälter müssen Beschädigungen der Membran und unzureichender Kontakt der Teile vermieden werden. Dann wird das obere Puffer-Reservoir angebracht und das Gelstückchen in die Patrone gegeben. Es muß die Oberseite der Fritte berühren. Man sollte sich noch einmal versichern, daß sich weder in der Patrone noch im Auffangbehälter noch darunter Luftblasen befinden. Das obere Puffer-Reservoir wird so weit mit Puffer gefüllt, daß die Elektroden vollständig bedeckt sind. Das Gehäuse ist sorgfältig mit dem Sicherheitsdeckel zu verschließen, bevor die Elektroden angeschlossen und mit der Stromquelle verbunden werden. Die Elektrophorese wird bei 100 Volt für eine Dauer zwischen 20 min und 2 h durchgeführt. Die Dauer der Elektrophorese ist abhängig von der Dauer der Gelelektrophorese, dem Agarosegehalt des Gels und der zu eluierenden DNA-Menge.

Nach Beendigung der Elektroelution kann das Gelstückchen im UV-Licht auf DNA-Reste überprüft werden. Befindet sich noch DNA im Gel, so kann die Elution fortgesetzt werden, bis kein Ethidiumbromid mehr zu sehen ist. Anschließend wird der Deckel des Gehäuses geöffnet und der Puffer abpipettiert. Das Auffanggefäß ist äußerst vorsichtig von der Patrone zu lösen. Es sollte kein Puffer aus der Patrone in den Napf nachtropfen. Der die DNA enthaltende Puffer wird in ein Reagenzglas pipettiert. Die DNA kann nun durch eine Ethanol-fällung konzentriert werden.

3.1.14 DIG-Markierung der RNA

Das nicht-radioaktive DIG-System funktioniert nach folgendem Prinzip: Es benutzt Digoxigenin, ein Steroid-Hapten, zur Markierung von DNA, RNA oder Oligonukleotiden. DIG-markierte RNA-Proben werden durch in vitro-Transkription klonierter DNA mit SP6/T7 oder T3-Polymerasen hergestellt. Hierfür verwendet man SP6 oder T7 RNA-Polymerasen und als Substrat Uridin-Triphosphat, das mit Digoxigenin markiert ist (DIG-UTP). DIG-markierte RNA kann dann zur Hybridisierung von Northern blots eingesetzt werden. Detektiert wird immunologisch mit Anti-Digoxigenin-Fab-Fragmenten, die mit alkalischer Phosphatase konjugiert sind.

Die zu transkribierende DNA wird in die Polylinkerregion geeigneter Transkriptionsvektoren (z.B. pSPT18) kloniert, welche Promotoren für die SP6- oder T7-RNA-Polymerase enthalten. Nach Linearisierung der DNA-Vorlage werden mit Hilfe der RNA-Polymerasen „run off“-Transkripte erzeugt. DIG-UTP dient als Substrat und wird in das Transkript eingebaut. Jedes 20. bis 25. Nukleotid der neu synthetisierten

RNA ist ein DIG-UTP. Da die Nukleotidkonzentration im Standard-Ansatz kein limitierender Faktor ist, kann eine große Menge markierter RNA erzeugt werden. Unter Standardbedingungen werden von 1 µg Template-DNA etwa 10 µg DIG-markierte RNA voller Länge transkribiert. DIG-markierte RNA-Sonden bieten den Vorteil, daß sie von definierter einheitlicher Menge sind und als Einzelstrang vorliegen, und daher die gesamte markierte RNA für die Hybridisierung zur Verfügung steht.

Es wird folgendermaßen vorgegangen: Bevor die Transkriptionsreaktion begonnen wird, muß die klonierte DNA durch Restriktionsverdau linearisiert werden. Um die Transkription unerwünschter Sequenzen zu vermeiden, sollte ein Restriktionsenzym, welches 5'-Überhänge oder glatte Enden erzeugt, verwendet werden. Die Schnittstelle muß für die Synthese einer antisense-RNA, wie sie zur Hybridisierung eines Northern blots benötigt wird, am 5'-Ende der cDNA liegen und das Enzym sollte nicht innerhalb der cDNA schneiden.

Nach dem Restriktionsverdau muß die DNA durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung gereinigt werden. Hierfür wird die vorhandene DNA-Menge mit 1x TE-Puffer auf 100 µl aufgefüllt. Es wird ein Volumen Phenol/Chloroform hinzugegeben, gründlich durchgemischt und anschließend 5 bis 10 min bei 14000 Upm und 18° C zentrifugiert. Die wässrige Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß transferiert. Um eine definierte Endkonzentration von 0.25 µg/µl zu erreichen, wird die DNA mit 3 N NaOAc und dem 2.5fachen Volumen 100 %igem Ethanol gefällt. Der Ansatz muß mindestens 30 min auf Eis bei -4° C stehen und wird dann 10 min bei 14000 Upm und 4° C zentrifugiert. Nach Waschen des Sediments mit 70 %igem Ethanol und Trocknen wird die DNA in TE-Puffer gelöst. Das Volumen an Puffer wird mit Hilfe der bekannten Menge eingesetzter DNA so gewählt, daß die Endkonzentration bei 0.25 µg/µl liegt.

Für den Markierungsansatz werden folgende Reagenzien in ein auf Eis gelagertes RNase-freies Gefäß pipettiert: 1 µg gereinigte DNA, 2 µl 10x NTP-Markierungs-Mix, 2 µl 10x Transkriptionspuffer, 1 µl RNase-Inhibitor sowie 2 µl SP6 oder T7 RNA-Polymerase. Um die Ausbeute an markierter RNA zu erhöhen, kann ein fünffacher Markierungsansatz verwendet werden. Die Menge der eingesetzten DNA bleibt 1 µg, alle anderen Reagenzien werden in der fünffachen Menge eingesetzt. Als Positivkontrolle dient eine im Markierungskit enthaltene Kontroll-DNA, die parallel nach den gleichen Angaben markiert wird.

Der Ansatz wird vorsichtig gemischt, kurz abzentrifugiert und für eine Dauer von 2 h bei 37° C inkubiert. Normalerweise ist es nicht notwendig, die transkribierte DNA mit DNase zu verdauen. Wird dies jedoch gewünscht, so kann die DNA durch Zugabe von 2 µl RNase-freier DNase beseitigt werden, anschließend muß 15 min bei 37° C inkubiert werden. Unabhängig davon, ob man eine DNase-Behandlung durchgeführt hat oder nicht, wird nun die Reaktion durch Zugabe von 2 µl 0.2 molarer EDTA-Lösung mit einem pH von 8.0 gestoppt. Die markierte RNA wird mit 2.5 µl 4 molarem LiCl und 75 µl tiefgefrorenem Ethanol (-20° C) gefällt. Der Reaktionsansatz ist gut zu mischen und muß mindestens 30 min bei -70° C oder 2 h bei -20° C stehen. Nach der Fällung wird 15 min lang bei 12000 Upm zentrifugiert, das Sediment mit 70 %igem kaltem Ethanol gewaschen, im Vakuum getrocknet und 30 min lang bei 37° C in 100 µl DEPC-Wasser gelöst. Um eine Kontamination mit RNasen zu verhindern, kann 1 µl RNase-Inhibitor zugegeben werden.

Die Menge neu synthetisierter markierter RNA ist abhängig von Menge, Größe und Reinheit der verwendeten DNA. In der Standard-Reaktion mit 1 µg DNA pro Versuchsansatz werden etwa 37 % der Nukleotide in ungefähr 10 µg der transkribierten DIG-markierten RNA eingebaut. Die Menge an neu synthetisierter DIG-markierter RNA kann mit Hilfe der markierten Kontroll-RNA durch Hybridisierung oder direkte Detektion angenähert werden. Das erhaltene Transkript kann mit Agarosegel-Elektrophorese und Etidiumbromidfärbung analysiert werden und die Ausbeute kann anhand des Verhältnisses der DNA- zur RNA-Bande abgeschätzt werden.

3.1.15 Vorhybridisierung und Hybridisierung

Die Vorhybridisierung dient der Besetzung ungesättigter Bindungsstellen.

Der Northern blot wird in einen Plastikbeutel gegeben, in dem sich 20 ml auf 68° C vorgewärmter Hybridisierungslösung (DIG Easy Hyb) pro 100 cm² Membranoberfläche befinden. Der Beutel wird dicht an der Membran entlang zugeschweißt. Es wird mindestens 60 min bei einer Temperatur von 68° C vorhybridisiert.

Währenddessen wird die Hybridisierungsprobe vorbereitet. Es werden 50 bis 100 ng DIG-markierte RNA pro 1 ml Hybridisierungslösung benötigt. Die Probe wird 10 min bei 95° C im Wasserbad oder Heizblock denaturiert, im Eisbad abgeschreckt, kurz zentrifugiert und in frische vorgewärmte Hybridisierungslösung gegeben. Die Vorhybridisierungslösung wird aus dem Beutel pipettiert und die Hybridisierungslösung

mit der Probe hineingegeben. Es wird dicht an der Membran zugeschweißt und über Nacht bei 68° C hybridisiert.

3.1.16 Detektion

Nach der Hybridisierung wird der Blot zunächst zweimal 5 min in einer Petrischale mit 2x SSC, 0.1 % SDS bei Raumtemperatur und zweimal 15 min mit 0.1x SSC, 0.1 % SDS bei 68° C unter leichtem Schütteln gewaschen.

Vor der Detektion wird die Membran kurz in einer Petrischale mit Maleinsäurepuffer equilibriert. Dann wird die Hybridisierungsreaktion mit einem 1:10 Gemisch aus Blockierungsreagenz und Maleinsäurepuffer, in dem der Blot 30 min lang liegt, gestoppt. Der DIG-Antikörper wird im Verhältnis 1:3000 in den Blockierungspuffer gegeben und die Membran 30 min lang bei leichtem Schütteln hineingelegt. Anschließend wird jeweils 10 min zweimal mit 2x SSC/TWEEN und einmal nur mit 2x SSC gewaschen.

Für die Detektion werden Detektionslösung 1 und 2 im Verhältnis 1:1 gemischt und genau 1 min lang auf die Vorderseite der Membran gegeben. Schnelles und sicheres Arbeiten ist notwendig, sobald die Membran mit der Detektionslösung in Kontakt gekommen ist. Die überschüssige Detektionslösung wird auf Whatman-Papier abgetupft. Der Northern blot wird mit der Vorderseite nach unten auf Klarsichtfolie gelegt und möglichst ohne Luftblasen darin eingeschlagen.

Der Northern blot wird in der Klarsichtfolie mit der Vorderseite nach oben in eine Röntgencassette gelegt, ein Röntgenfilm darauf. Die benötigte Belichtungszeit hängt von der Stärke des Signals und von der Menge der auf das Agarosegel aufgetragenen RNA ab. Für die Entwicklung wird der Röntgenfilm 3 min in die Entwicklerlösung und 6 min in die Fixiererlösung gegeben.

3.1.17 Reverse Transkription von Total-RNA

Um die Total-RNA revers zu transkribieren, werden Oligo-dT-Primer benutzt, welche mit den 3'-poly(A)-Enden eukaryotischer mRNAs hybridisieren.

In einem sterilen Reaktionsgefäß werden 1 µl Oligo (dT)₁₂₋₁₈ (500 µg/ml) und 3.5 µg Total-RNA zusammengegeben. Das Gemisch wird mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 12 µl aufgefüllt, 10 min lang auf 70° C erhitzt und sofort auf Eis abgekühlt. Nach kurzem Abzentrifugieren gibt man nacheinander 4 µl 5x First Strand

Puffer, 2 µl 0.1 M DTT und 1 µl 10 mM dNTP Mix hinzu. Nach sorgfältigem Mischen wird der Ansatz 2 min bei 42° C inkubiert, dann wird 1 µl (200 Einheiten) Superscript II hinzugefügt, mehrmals auf- und abpipettiert und für 50 min bei 42° C inkubiert. Die Reaktion wird durch 15minütiges Erhitzen auf 70° C gestoppt. Die cDNA kann nun zur Vervielfältigung in die Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt werden. Zuvor kann die komplementäre RNA mit 1 µl (2 Einheiten) RNase verdaut werden. Hierzu muß das Gemisch nach Zugabe der RNase 20 min bei 37° C inkubiert werden.

3.1.18 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Die Polymerase-Kettenreaktion basiert auf der Verwendung einer thermostabilen, DNA-abhängigen DNA-Polymerase (Taq) und erlaubt die Vervielfältigung spezifischer DNA-Fragmente, die durch die in der Reaktion verwendeten 5'- und 3'-Primer festgelegt sind. Die PCR besteht aus einer wiederholten Abfolge von Zyklen, die jeweils die Schritte Denaturierung, Primeranlagerung und Elongation beinhalten. Nach der in der Regel bei 94-96° C stattfindenden Denaturierung der DNA wird das Reaktionsgemisch bis zu derjenigen Temperatur abgekühlt, bei der die Primer spezifisch mit den zu amplifizierenden DNA-Fragmenten hybridisieren. Diese Temperatur, die für jedes Primerpaar getrennt bestimmt werden muß, hängt von der Länge der verwendeten Primer und ihrem Gehalt an den Basen A und T bzw. G und C ab. Anschließend wird das Reaktionsgemisch auf 72° C erhitzt, so daß die bei dieser Temperatur aktive thermostabile DNA-Polymerase in Gegenwart von Mg²⁺ die Primer unter Verwendung der cDNA als Vorlage elongieren kann. Mit jedem solchen Zyklus verdoppelt sich die Menge der erhaltenen DNA-Fragmente, so daß die Anzahl vorhandener Kopien exponentiell zunimmt.

Der entscheidende Schritt jeder PCR ist das spezifische Binden der Primer an die Vorlage. Neben der Temperatur sind hierfür auch der pH-Wert der Lösung und die MgCl₂-Konzentration von Bedeutung und können sich bei den verschiedenen Primern unterscheiden. Die Optimalbedingungen müssen daher für jede PCR neu bestimmt werden.

Es wird folgendermaßen vorgegangen: In einem PCR-Reaktionsgefäß werden folgende Reagenzien zusammengegeben:

10 µl	10x PCR-Puffer
3 µl	50mM MgCl ₂
2 µl	10mM dNTP-Mix
1 µl	Amplifizierungs-Primer 1 (10µM)
1 µl	Amplifizierungs-Primer 2 (10µM)
1 µl	Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)
2 µl	cDNA (aus der Reverse-Transkriptase-Reaktion)
80 µl	autoklaviertes, destilliertes Wasser

Der Ansatz ist sorgfältig zu mischen und mit zwei Tropfen (etwa 100 µl) Silikonöl zu bedecken. Anschließend erfolgt die Denaturierung für eine Dauer von 3 min bei 94° C. Es werden 15 bis 40 Zyklen der PCR durchgeführt.

3.2 Material

3.2.1 Zellmaterial

Verwendet wurden menschliche retinale Pigmentepithelzellen der Zelllinie ARPE-19, die wir von Herrn Weber aus der Humangenetik der Universitätsklinik Würzburg erhielten.

Die humanen Fibroblasten stammen von Frau Herderich aus der Humangenetik der Universitätsklinik Würzburg.

Die menschlichen Gliomazellen der Zelllinie U 251 (Passage 151; 0.66 µg/ml) erhielten wir von Sven Wagner aus der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik der Universitätsklinik Würzburg.

Die Bakterien des Stammes E. coli: DH 5α, die für die Transformation eingesetzt wurden, wurden von der Firma Life Technology bezogen.

3.2.2 Interferone

Es wurden kommerzielle Interferone Typ I sowie Typ II verwendet, die von der Firma Boehringer, Ingelheim bezogen wurden.

3.2.3 Reagenzien und Lösungen

Die folgenden Reagenzien und Lösungen wurden nach den aufgeführten Vorschriften hergestellt beziehungsweise von den angegebenen Firmen bezogen. Sofern nicht anders angegeben, stammen die Angaben für selbst hergestellte Lösungen und Puffer aus dem Labor-Handbuch von Sambrook, Fritsch und Maniatis [45].

MEM (Minimum Essential Medium):

0.6 mM Arginin, 0.1 mM Cystin, 2.0 mM Histidin, 0.4 mM Isoleucin, 0.4 mM Leucin, 0.4 mM Lysin, 0.1 mM Methionin, 0.2 mM Phenylalanin, 0.4 mM Threonin, 0.005 mM Tryptophan, 0.2 mM Tyrosin, 0.4 mM Valin, 5.5 mM Glucose, 116 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1.0 mM MgCl₂ x 2 H₂O, 23.8 mM NaHCO₃, 1 mg/l Cholin, 1 mg/l Folsäure, 2 mg/l Inositol, 1 mg/l Nicotinamin, 1 mg/l Pantothersäure, 1 mg/l Pyridoxal, 0.1 mg/l Riboflavin, 1 mg/l Thiamin.

Zu diesem Medium werden 10 bzw. 15 % fötales Kälberserum sowie 2×10^5 Einheiten Antibiotikum (Penicillin und Streptomycin) gegeben. Der pH-Wert wird mit NaHCO_3 und Phenolrot als Indikator auf 7.2-7.4 eingestellt. [11]

ATV (Ansatz für 10 l):

80 g NaCl, 4 g KCl, 10 g D(+) Glucose, 5,8 g NaHCO_3 , 5 g Trypsin (Difco 1:250), 2 g Versine (EDTA-disodium)

PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung):

136 mM NaCl, 2.6 mM KCl, 8.1 mM Na_2HPO_4 , 1.4 mM KH_2PO_4 , 0.9 mM CaCl_2 , 0.49 mM $\text{MgCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$.

Der pH-Wert wird auf 7.2 eingestellt.

Proteinase K der Firma Boehringer, Mannheim

Proteinase K-Puffer (2x):

0.4 M Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM EDTA, 0.6 M NaCl, 4% SDS.

DEPC der Firma Roth, Karlsruhe

DEPC-H₂O:

1 l steriles H_2O , 1 ml DEPC

MOPS-Puffer (10x):

0.2 M Morpholinopropansulfonsäure, 100 mM Na-Acetat, 10 mM EDTA.

Der pH-Wert wird auf 7.0 abgeglichen.

RNA-Puffer:

250 μl Formamid, 83 μl Formaldehyd, 50 μl 10x MOPS-Puffer.

Der RNA-Puffer ist frisch herzustellen.

Gelladepuffer:

0.4% Bromphenolblau, 50% Glycerin

RNA-Marker der Firma Promega, Mannheim

DNA-Marker der Firma Boehringer, Mannheim

Nylonmembranen der Firma Boehringer, Mannheim

Whatman-Papier der Firma Schleicher & Schuell, Dassel

SSC-Puffer (20x):

3 M NaCl, 300 mM Na-Citrat (pH 7.0), DEPC-H₂O.

pSPT 18-Vektor: Bestandteil des DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) der Firma Boehringer, Mannheim

T4 DNA Ligase Kit der Firma Promega, Mannheim (enthält T4 Ligase sowie 10 x Ligase Puffer)

Ligase-Puffer (10x):

300 mM Tris-HCl (pH 7.8), 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 10 mM ATP

Bacto-Tryptane der Firma Difco, Augsburg

Bacto-Yeast-Extract der Firma Gibco BRL, Eggenheim

LB-Medium (5x):

950 ml steriles Wasser, 50 g Bacto-Tryptone, 25 g Bacto-Yeast-Extrakt, 50 g NaCl.

Der Ansatz wird mit 5N NaOH auf einen pH von 7.0 abgeglichen, mit sterilem Wasser auf ein Volumen von einem Liter aufgefüllt und autoklaviert. Um das Wachstum unerwünschter Bakterien zu hemmen, wird ein Antibiotikum in einer 1:1000 Verdünnung hinzugegeben (1 ml Ampicillin auf 1 Liter 1x LB-Medium).

STE-Puffer:

0.1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0).

Lysozym-Lösung:

Lysozym der Firma SERVA Feinbiochemica GmbH&Co, Heidelberg (10 mg/ml) in 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)

Lösung 1:

50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0)

Lösung 2:

0.2 N NaOH, 1% SDS. Lösung 2 ist frisch herzustellen.

Lösung 3:

5 M K-Acetat, Eisessigsäure, H₂O

TE-Puffer (pH 8.0):

10 mM TrisHCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0)

DNase-freie Pankreas-RNase der Firma Boehringer, Mannheim

Restriktionsenzyme und Puffer:

Sal I (10U/μl) und Puffer 10 der Firma Gibco BRL,

Hind III (10 U/μl) und Puffer B der Firma Boehringer, Mannheim

Bam HI der Firma MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Sac II (20U/μl) und Puffer 1 der Firma New England Biolabs

Xho I (10U/μl) und Puffer R+BSA der Firma MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Eco R I (10U/μl) und Puffer H der Firma Boehringer, Mannheim

TBE-Puffer (5x):

54 g Trisbase, 27.5 g Borsäure, 20 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0), mit H₂O auf 1 l auffüllen.

DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) der Firma Boehringer, Mannheim

DIG Easy Hyb der Firma Boehringer, Mannheim

Maleinsäurepuffer:

0.1 M Maleinsäure, 0.15 M NaCl. Der Puffer ist mit NaOH auf einen pH-Wert von 7.5 abzugleichen und zu autoklavieren.

Blockierungsreagenz der Firma Boehringer, Mannheim

Blockierungspuffer:

Das Blockierungsreagenz ist 1:10 in Maleinsäurepuffer zu lösen.

DIG-Antikörper der Firma Boehringer, Mannheim

TWEEN 20 der Firma Merck, Darmstadt

Detektionslösung 1 und 2 des ECL-Systems der Firma Amersham LIFE SCIENCE,
Buchler GmbH & Co KG

Oligo-dT-Primer der Firma Gibco BRL, Eggenheim

First Strand Puffer der Firma Gibco BRL, Eggenheim

DTT der Firma Gibco BRL, Eggenheim

dNTP Mix (10 mM Basen) der Firma MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Superscript II der Firma Gibco BRL, Eggenheim

HotStar Taq PCR Kit der Firma MBI Fermentas, St. Leon-Rot (enthält HotStar Taq
DNA Polymerase, 10x PCR-Puffer sowie MgCl₂)

Amplifizierungsprimer der Firma Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe mit folgenden
Sequenzen:

5'> ATT TAT TTC TCG TTG CTG CTC ATG A <3'

5'> TAT GTT TTG TTC TTT TCC TTA TCA G <3'

4 ERGEBNISSE

4.1 Interferon-Behandlung der ARPE-19-Zelle

Neben der Frage, ob und in welchem Ausmaß eine Induktion bestimmter Gene durch Interferone stattfindet, interessierte uns auch die Frage, zu welchem Zeitpunkt nach der Interferonbehandlung ein Effekt sichtbar ist. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde eine Kinetik der Interferon-behandlung zunächst für verschiedene Zeitpunkte einige Stunden nach Interferongabe und schließlich noch zusätzlich in Abständen von wenigen Minuten durchgeführt. Letztere sollte verhindern, daß ein Effekt möglicherweise übersehen wird, der bereits nach sehr kurzer Zeit eintritt und zum Zeitpunkt der ersten Messung nach vier Stunden bereits nicht mehr sichtbar ist.

Für jede Kinetik wurden fünf Zeitpunkte für die RNA-Präparation festgelegt. Zusätzlich wurde eine RNA-Präparation un behandelter Pigmentepithelzellen durchgeführt sowie eine Präparation von Zellen, die nicht mit Interferon behandelt wurden, die jedoch zum Zeitpunkt der Interferongabe ebenso wie die Interferon-behandelten Zellen frisches Medium erhielten. Dies sollte ausschließen, daß ein möglicherweise sichtbarer Effekt als Interferon-Effekt mißgedeutet wird, der eigentlich durch den Mediumwechsel induziert wurde.

Versuchs- und Kontrollzellen wurden unter denselben Bedingungen kultiviert.

Ein Tag vor der Interferonbehandlung wurden die konfluenten RPE-Zellen in Petrischalen eingesetzt und mit 500 Einheiten/ml Medium humanem Interferon Typ I oder Typ II behandelt.

Für die erste Kinetik wurden folgende Zeitpunkte festgesetzt: vier, acht, 12, 24 und 36 Stunden nach Interferonbehandlung. Für die Kinetik in Minutenabständen wurden folgende Zeitpunkte festgesetzt: fünf, zehn, 30, 70 und 120 Minuten nach Interferon-Behandlung.

An den vorgegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen nach der LiCl-Methode geerntet.

Bei der Konzentrationsbestimmung der RNA aus 1:100 Verdünnungen im Spektralphotometer erhielten wir für die Zeitkinetik, bei der die Zellen für die Dauer von Stunden mit den humanen Interferonen behandelt wurden, folgende Werte:

0 h, Ø Interferon (Kontrolle)	2,0 µg/ml
4 h, Ø Interferon (Mediumwechsel)	7,0 µg/ml
4 h, Interferon α	2,9 µg/ml
4 h, Interferon γ	2,3 µg/ml
8 h, Interferon α	5,0 µg/ml
8 h, Interferon γ	4,7 µg/ml
12 h, Interferon α	2,3 µg/ml
12 h, Interferon γ	5,0 µg/ml
24 h, Interferon α	6,6 µg/ml
24 h, Interferon γ	6,9 µg/ml
36 h, Interferon α	2,2 µg/ml
36 h, Interferon γ	1,8 µg/ml

Die gewonnene RNA wurde nun mit Hilfe der Gelelektrophorese aufgetrennt. Da die bei der RNA-Präparation erhaltenen Konzentrationen zum Teil deutlich unterschiedlich waren, wurden zunächst verschiedene „Probegele“ gefahren, um herauszufinden, welche Menge der RNA verschiedener Zeitpunkte auf das Gel aufgebracht werden sollte, um annähernd gleiche Mengen an RNA zu erhalten.

Dann erfolgte die Gelelektrophorese für die RNA aus der Kinetik mit den Stundenabständen. Es wurden zwei Agarosegele hergestellt, eines für die RNA aus den mit humanem Interferon α behandelten Zellen und eines für die RNA aus den mit humanem Interferon γ behandelten Zellen.

Die Mengen der aufgetragenen RNA richtete sich nach den vorangegangenen „Probegelen“. Die RNA wurde denaturiert, mit Gelladepuffer versetzt und zusammen mit einem RNA-Marker auf das Agarosegel aufgetragen. Nach Auftrennen der RNA wurde das Gel im UV-Licht fotografiert.

Für die RNA aus den mit humanem Interferon α behandelten Zellen erhielten wir folgendes Ergebnis:

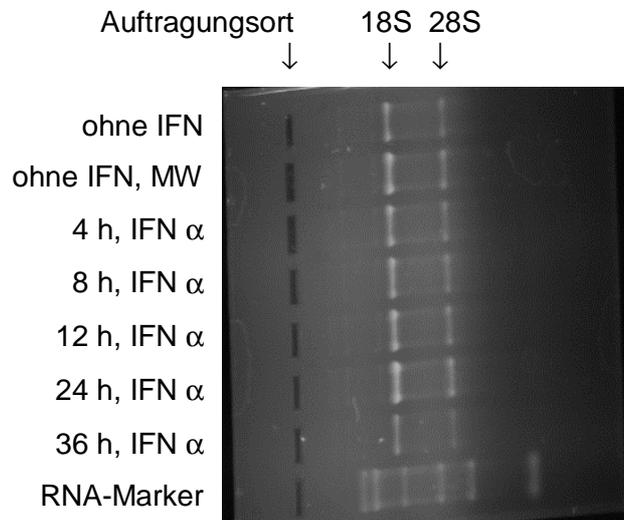


Abb. 2a: RNA aus für die Dauer von 4 bis 36 h mit Interferon α behandelten ARPE-19-Zellen

ARPE-19-Zellen wurden für die Dauer von 4, 8, 12, 24 und 36 h mit 500 Einheiten/ml Medium IFN α behandelt, die RNA präpariert und Aliquots auf ein Agarosegel aufgetragen (Spuren 3 bis 7). Als Kontrolle dient die RNA aus unbehandelten ARPE-19-Zellen (Spur 1) sowie die RNA aus ARPE-19-Zellen, die nach 4 h frisches Medium erhielten (MW = Mediumwechsel; Spur 2). Parallel läuft ein RNA-Marker (Spur 8).

Zu erkennen sind Banden in Höhe der verschiedenen Anteile der ribosomalen RNA (18S, 28S). Die Mengen aufgebrachtener RNA sind immer noch unterschiedlich. Dies muß bei der Verwendung des Gels als Northern blot zur Hybridisierung berücksichtigt werden, damit nicht fälschlicherweise eine Induktion interpretiert wird.

Für die RNA aus den mit humanem Interferon γ behandelten Zellen erhielten wir folgendes Ergebnis:

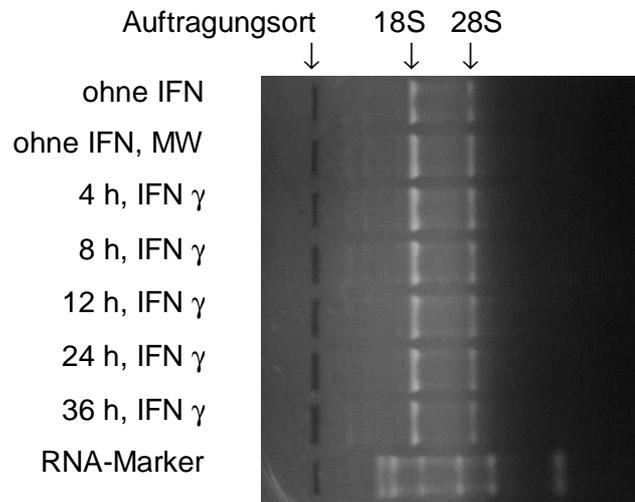


Abb. 2b: RNA aus für die Dauer von 4 bis 36 h mit Interferon γ behandelten ARPE-19-Zellen

ARPE-19-Zellen wurden für die Dauer von 4, 8, 12, 24 und 36 h mit 500 Einheiten/ml Medium IFN γ behandelt, die RNA präpariert und Aliquots auf ein Agarosegel aufgetragen (Spuren 3 bis 7). Als Kontrolle dient die RNA aus unbehandelten ARPE-19-Zellen (Spur 1) sowie die RNA aus ARPE-19-Zellen, die nach 4 h frisches Medium erhielten (MW = Mediumwechsel; Spur 2). Parallel läuft ein RNA-Marker (Spur 8).

Zu erkennen sind Banden in Höhe der verschiedenen Anteile der ribosomalen RNA (18S, 28S). Die unterschiedlichen RNA-Mengen müssen bei der Interpretation späterer Röntgenfilme berücksichtigt werden.

Beide Gele wurden über Nacht geblottet, wie in Kapitel III.1.5 beschrieben.

Gleichermaßen wurde mit den Zellen verfahren, die nur für die Dauer von Minuten mit den humanen Interferonen Typ I beziehungsweise Typ II behandelt wurden. Hier erhielten wir bei der RNA-Präparation für 1:100 Verdünnungen folgende RNA-Konzentrationen:

0 min, ∅ Interferon (Kontrolle)	6.4 µg/ml
10 min, ∅ Interferon (Mediumwechsel)	10,0 µg/ml
5 min, Interferon α	6,0 µg/ml
5 min, Interferon γ	6,2 µg/ml
10 min, Interferon α	14,0 µg/ml
10 min, Interferon γ	17,0 µg/ml
30 min, Interferon α	13,0 µg/ml
30 min, Interferon γ	11,0 µg/ml
70 min, Interferon α	5,0 µg/ml
70 min, Interferon γ	4,9 µg/ml
120 min, Interferon α	7,1 µg/ml
120 min, Interferon γ	13,0 µg/ml

Es wurden ebenfalls verschiedene „Probegele“ gefahren, dann wurden geeignete Mengen RNA denaturiert, mit Gelladepuffer versetzt und auf zwei Agarosegele, eines für die RNA aus den mit humanem Interferon α, eines für die RNA aus den mit humanem Interferon γ behandelten Zellen, aufgetragen.

Für die RNA aus den mit humanem Interferon α behandelten Zellen erhielten wir folgendes Ergebnis:

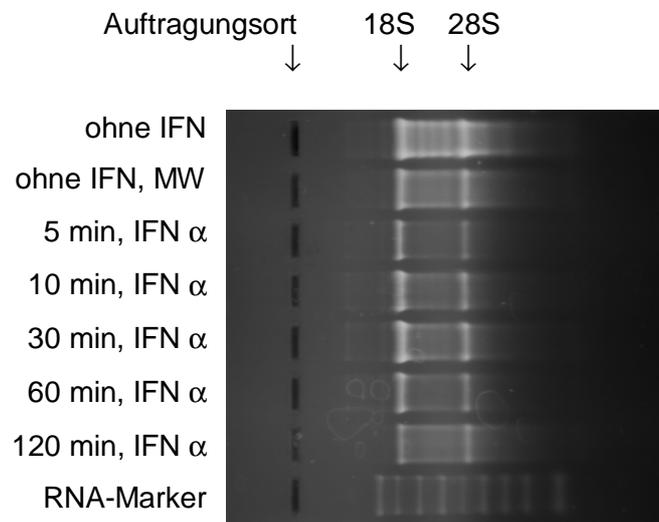


Abb. 3a: RNA aus für die Dauer von 5 bis 120 min mit Interferon α behandelten ARPE-19-Zellen

ARPE-19-Zellen wurden für die Dauer von 5, 10, 30, 60 und 120 min mit 500 Einheiten/ml Medium IFN α behandelt, die RNA präpariert und Aliquots auf ein Agarosegel aufgetragen (Spuren 3 bis 7). Als Kontrolle dient die RNA aus unbehandelten ARPE-19-Zellen (Spur 1) sowie die RNA aus ARPE-19-Zellen, die nach 5 min frisches Medium erhielten (MW = Mediumwechsel; Spur 2). Parallel läuft ein RNA-Marker (Spur 8).

Zu erkennen sind Banden in Höhe der verschiedenen Anteile der ribosomalen RNA (18S, 28S). Wieder differieren die Mengen der aufgetragenen RNA.

Das Agarosegel mit der RNA aus den mit humanem Interferon γ behandelten Zellen sah im UV-Licht folgendermaßen aus:

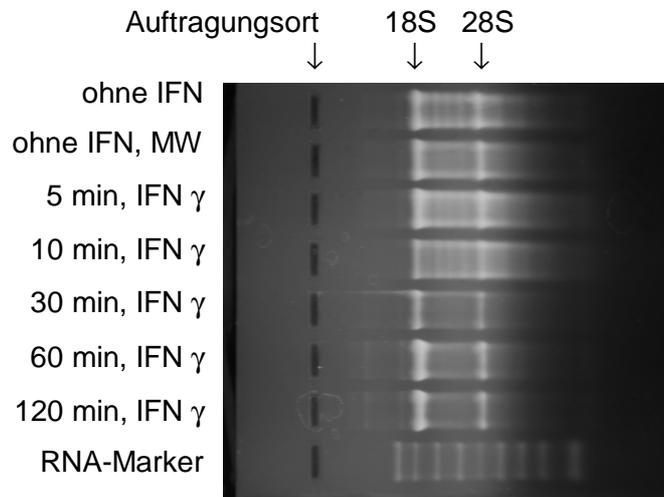


Abb. 3b: RNA aus für die Dauer von 5 bis 120 min mit Interferon γ behandelten ARPE-19-Zellen

ARPE-19-Zellen wurden für die Dauer von 5, 10, 30, 60 und 120 min mit 500 Einheiten/ml Medium IFN γ behandelt, die RNA präpariert und Aliquots auf ein Agarosegel aufgetragen (Spuren 3 bis 7). Als Kontrolle dient die RNA aus unbehandelten ARPE-19-Zellen (Spur 1) sowie die RNA aus ARPE-19-Zellen, die nach 5 min frisches Medium erhielten (MW = Mediumwechsel; Spur 2). Parallel läuft ein RNA-Marker (Spur 8).

Zu erkennen sind Banden in Höhe der verschiedenen Anteile der ribosomalen RNA (18S, 28S), die aufgrund unterschiedlicher Mengen der aufgebrauchten RNA unterschiedlich hell erscheinen.

Beide Agarosegele wurden wiederum geblottet und die Northern blots bei 4° C aufbewahrt.

In gleicher Weise wurde noch mehrmals verfahren, so daß für die nachfolgenden Hybridisierungen ein gewisser Vorrat an Northern blots bereit stand.

4.2 Untersuchung des Collagenase-Gens

4.2.1 Präparation eines Plasmids mit der genetischen Information des Collagenase-Gens

Vom Institut für Genetik des Forschungszentrums für Technik und Umwelt Karlsruhe erhielten wir das Insert mit der genetischen Information des Collagenase-Gens im pUC-Vektor, das zunächst in den pSPT 18-Vektor umkloniert wurde. Hierzu wurde das Insert mit den Restriktionsenzymen Sal I und Hind III aus dem pUC-Vektor ausgeschnitten. 550 ng DNA ($\cong 5 \mu\text{l}$) wurden mit 17.0 μl DEPC-Wasser, 2.5 μl 10x Sal I-Puffer und 0.5 μl Sal I (10 Einheiten/ μl) 90 min bei 37° C inkubiert. Aus diesem Ansatz wurden anschließend 18 μl mit 0.5 μl Hind III (10 Einheiten/ μl) 120 min bei 37° C verdaut. Die DNA wurde auf einem 1 %iges Agarosegel aufgetrennt und die Bande bei 2000 bp, die dem Insert mit der genetischen Information des Collagenase-Gens entspricht, ausgeschnitten und anschließend eluiert, wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben. Die geschätzte Konzentration der erhaltenen DNA betrug 25-30 ng/ μl .

1 μg ($\cong 4.0 \mu\text{l}$) des pSPT 18-Vektor wurde mit jeweils 0.5 μl der Enzyme Sal I (10 Einheiten/ μl) und Hind III (10 Einheiten/ μl) 150 min lang verdaut. Um eine Selbstligation des Vektors zu verhindern, wurden die 5'-Enden mit 0.5 μl Shrimp Alkalische Phosphatase 6 h lang bei einer Temperatur von 37° C dephosphoriliert. Für die Ligation wurden 1.8 μl ($\cong 89 \text{ ng}$) des pSPT 18-Vektors sowie 5.7 μl ($\cong 172 \text{ ng}$) des Inserts mit der genetischen Information des Collagenase-Gens mit 1.0 μl DEPC-Wasser, 1.0 μl 10x Ligase-Puffer und 0.5 μl T4 DNA Ligase zusammengegeben und 8 h bei 4° C stehen gelassen.

Das Insert mit der genetischen Information der humanen Collagenase befand sich nun im pSPT 18-Vektor.

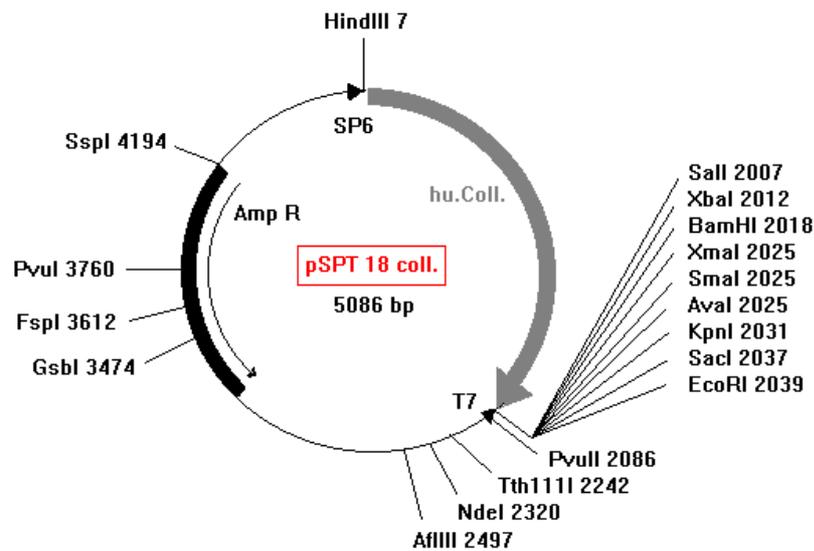


Abb. 4: Plasmidkarte für humane Collagenase im pSPT-18-Vektor

Das Plasmid setzt sich aus dem pSPT 18-Vektor und dem Insert mit der genetischen Information des Collagenase-Gens (grauer Pfeil; hu. Coll. = humane Collagenase) zusammen. Im Bereich des Vektors befindet sich die Information für eine Ampicillinresistenz (Amp R). Das Insert wird von den Ansatzstellen für die SP6 und T7 Polymerase eingefasst. Die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme im Bereich des pSPT 18-Vektors sind angegeben (z.B. Schnittstelle für Hind III bei 7 bp). Die Länge des pSPT 18-Vektors beträgt 3104 bp, die des Inserts 1982 bp und die des Gesamt-Plasmids 5086 bp.

Das Plasmid wurde in Bakterien des E.coli-Stammes DH 5 α wie in Kapitel III.1.7 beschrieben transformiert. Die Bakterien wurden anschließend in 1x LB-Medium angezüchtet und das Collagenase-Plasmid nach Vorschrift III.1.10 präpariert. Die Konzentration der Collagenase-DNA betrug 320 μ g/ml.

Um das Ergebnis der Plasmidpräparation zu überprüfen, wurde ein Probeverdau des Plasmids durchgeführt. Anhand der Plasmidkarte wurden Hind III und Bam HI als geeignete Restriktionsenzyme für den Probeverdau ausgewählt, da diese Enzyme das Insert aus dem Vektor herausschneiden. Für die nachfolgende Gelelektrophorese wurden zwei Banden definierter Länge erwartet: der pSPT 18-Vektor mit einer Länge von 3104 Basenpaaren und das Insert mit einer Länge von etwa 2000 Basenpaaren.

Nach der Inkubation über Nacht wurde der gesamte Probeverdau (10 µl) auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen und die DNA 90 min lang bei einer Spannung von 80 Volt aufgetrennt. Es erfolgte eine Auftrennung in zwei scharfe Banden der erwarteten Länge (Foto des Gels nicht abgebildet).

4.2.2 Herstellung einer Digoxigenin-markierten RNA der Collagenase-DNA

Für den Markierungsansatz wurde 1 µg linearisierter DNA benötigt. Um einen Vorrat für weitere Markierungen zu haben, wurden 10 µg (\cong 32 µl) des Collagenase-Plasmids mit dem Restriktionsenzym Hind III linearisiert.

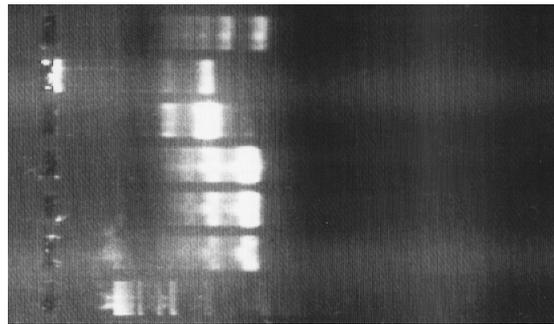
Mit Hilfe der Gelelektrophorese wurde das Ergebnis der Linearisierung überprüft. Erwartungsgemäß zeigte sich eine scharfe Bande auf Höhe von ca. 5 Kilobasenpaaren (Gesamtlänge des Collagenase-Plasmids: 5086 Basen-paare), so daß von einer erfolgreichen Linearisierung ausgegangen werden konnte.

Vor der eigentlichen Markierung erfolgten eine Phenol/Chloroform-Extraktion und eine Konzentrierung durch Fällung.

Um eine möglichst hohe Ausbeute an Digoxigenin-markierter RNA zu erhalten, wurde ein fünffacher Markierungsansatz verwendet. Zur Herstellung einer anti-sense-RNA wurde eine T7-Polymerase eingesetzt. Parallel zur Markierung des Collagenase-Plasmids lief ein einfacher Markierungsansatz einer Kontroll-DNA. Die Markierung wurde wie in Kapitel III.1.14 beschrieben durchgeführt und das Ergebnis durch eine Gelelektrophorese überprüft.

Aufgetragen wurden je 1 µl der markierten Collagenase-RNA vor der Fällung, die den letzten Schritt der Markierung darstellt, 1 µl der markierten Collagenase-RNA nach Fällung und 1 µl der markierten RNA der Kontroll-DNA, zusätzlich ließen wir drei verschiedene Volumina der Kontroll-RNA aus dem Kit mit der Konzentration 200 ng/µl mitlaufen, um die Menge der erhaltenen markierten Collagenase-RNA abschätzen zu können. Es zeigte sich, daß zwar durch die LiCl-Fällung im letzten Schritt markierte RNA verloren gegangen war, dennoch konnte eine recht gute Ausbeute erreicht werden (100 µl RNA mit einer geschätzten Konzentration von circa 100 ng/µl).

Positivkontrolle
 Coll-RNA nach Fällung
 Coll-RNA vor Fällung
 K-RNA 2,0 µl (= 400 ng)
 K-RNA 1,5 µl (= 300 ng)
 K-RNA 1,0 µl (= 200 ng)
 RNA-Marker



↑
 Auftragungsort

Abb 5: Herstellung einer Digoxigenin-markierten Collagenase-RNA

Vom Collagenase-Plasmid wurde eine DIG-markierte RNA hergestellt. Auf ein Agarosegel wurden von der markierten RNA zwei Aliquots aufgetragen, eines direkt nach dem Markierungsansatz (Spur 1) und eines nach der anschließenden Fällung (Spur 2). Als Positivkontrolle wurde parallel zur Markierung des Collagenase-Pöasmids eine Kontroll-DNA aus dem Kit markiert (Spur 1). Zur Abschätzung der erhaltenen Konzentration der markierten Coll-RNA wurden drei verschiedene Volumina einer Kontroll-RNA mit der Konzentration 200 ng/µl aufgetragen (Spuren 4 bis 6).

Es zeigt sich, daß die Markierung erfolgreich war. Im letzten Arbeitsschritt der Fällung ist zwar markierte Coll-RNA verloren gegangen, dennoch läßt sich eine Konzentration von etwa 100 ng/µl erreichen.

4.2.3 Vergleich Interferon-behandelter ARPE-19-Zellen mit unbehandelten ARPE-19-Zellen

Retinale Pigmentepithelzellen wurden mit 250 Einheiten/ml Medium Interferon α für eine Dauer von 20 Stunden behandelt. Anschließend erfolgte die RNA-Präparation dieser Zellen sowie unbehandelter Kontroll-Zellen. Für die RNA aus mit Interferon behandelten Zellen erhielten wir eine Konzentration von 2.0 µg/ml, für die RNA aus den Kontroll-Zellen 1.6 µg/ml. Es wurden je 3 µg RNA auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen und drei Stunden lang bei 35 mA aufgetrennt.

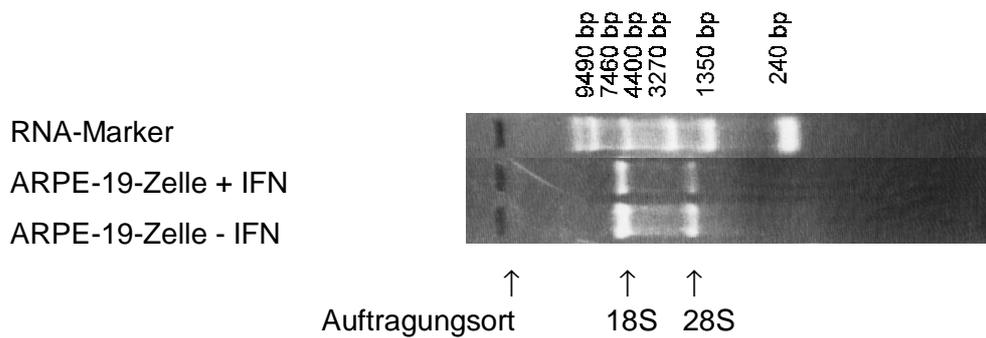


Abb. 6: RNA-Gel für den Vergleich Interferon-behandelter ARPE-19-Zellen mit unbehandelten ARPE-19-Zellen

ARPE-19-Zellen wurden mit 250 Einheiten/ml Medium Interferon α für eine Dauer von 20 Stunden behandelt. Anschließend erfolgte die RNA-Präparation dieser Zellen (ARPE-19-Zelle + IFN) sowie unbehandelter Kontroll-Zellen (ARPE-19-Zelle - IFN). Aliquots der RNAs wurden zum Vergleich auf ein Agarosegel aufgetragen (Spuren 2 und 3), parallel läuft ein RNA-Marker mit (Spur 1).

Zu erkennen sind Banden in Höhe der verschiedenen Anteile der ribosomalen RNA (18S, 28S).

Das Gel wurde fünf Stunden lang nach Vorschrift geblottet.

Der Northern blot wurde nach der Vorhybridisierung mit 500 ng (5 μ l RNA einer Konzentration von 100 ng/ μ l) Digoxigenin-markierter RNA mit der genetischen Information des Collagenase-Plasmids hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei einer Temperatur von 68° C. Am nächsten Tag wurde der Blot wie in Kapitel III.1.16 gewaschen und detektiert. Ein Röntgenfilm wurde mit dem detektierten Blot zunächst 30 Minuten lang belichtet, da nur ein sehr schwaches Signal sichtbar war, erfolgte eine zweite Belichtung für eine Dauer von 120 Minuten.

Es lassen sich zwei Banden differenzieren, die jedoch in Laufweite und Schwärzungsgrad mit den Banden des Agarosegels korrelieren. Es muß daher davon ausgegangen werden, daß eine Fehlhybridisierung mit der rRNA stattgefunden hat.

ARPE-19-Zelle + IFN

ARPE-19-Zelle - IFN

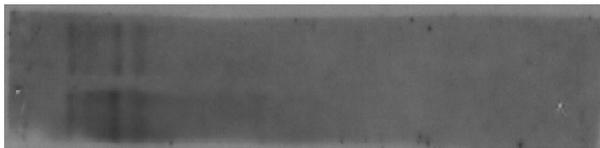


Abb. 7: Röntgenfilm für den Vergleich Interferon-behandelter ARPE-19-Zellen mit unbehandelten ARPE-19-Zellen

Die RNA aus mit 1200 Einheiten Interferon α für eine Dauer von 20 Stunden behandelten ARPE-19-Zellen (ARPE-19-Zelle + IFN) sowie die RNA aus unbehandelten ARPE-19-Zellen (ARPE-19-Zelle - IFN) wurden von einem Agarosegel (s. Abb. 6) mittels Northern blot-Methode auf eine Nylonmembran übertragen, mit 500 ng einer DIG-markierten Collagenase-RNA hybridisiert und nach Vorschrift detektiert. Ein Röntgenfilm wurde mit dem Northern blot 120 min belichtet.

Es lassen sich zwei Banden differenzieren, die jedoch in Laufweite und Schwärzungsgrad mit den Banden des Agarosegels korrelieren. Es muß daher davon ausgegangen werden, daß eine Fehlhybridisierung mit der rRNA stattgefunden hat.

4.2.4 Vergleich unterschiedlich lange mit Interferon behandelte ARPE-19-Zellen

ARPE-19-Zellen wurden für einen definierten Zeitraum (5, 10, 30, 60 und 120 Minuten bzw. 4, 8, 12, 24 und 36 Stunden) mit 500 Einheiten/ml Medium Interferon α bzw. Interferon γ behandelt. Zusätzlich wurden zum Zeitpunkt der ersten RNA-Präparation eine RNA-Präparation unbehalteter Pigment-epithelzellen durchgeführt sowie eine Präparation von Zellen, die nicht mit Interferon behandelt wurden, die jedoch zum Zeitpunkt der Interferongabe ebenso wie die Interferon-behandelten Zellen frisches Medium erhielten. Dies sollte ausschließen, daß ein möglicherweise sichtbarer Effekt als Interferon-Effekt mißgedeutet wird, der eigentlich durch den Mediumwechsel induziert wurde (vgl. Kapitel IV.1).

Die präparierte RNA wurde auf insgesamt drei zu blottenden Agarosegelen aufgetrennt. Verwendet wurden ein Maxigel mit der RNA der Zellen, die für die Dauer von vier bis 36 Stunden mit Interferon behandelt wurden, das in RNA aus mit Interferon γ und in RNA aus mit Interferon α behandelten RPE-Zellen unterteilt ist, sowie zwei Minigele mit der RNA aus für die Dauer von fünf bis 120 Minuten mit Interferon α beziehungsweise Interferon γ behandelten Zellen.

Für die beiden Minigele wurde die RNA auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen, und die Nukleinsäuren wurden 3 h lang bei einer Stromstärke von 35 mA aufgetrennt.

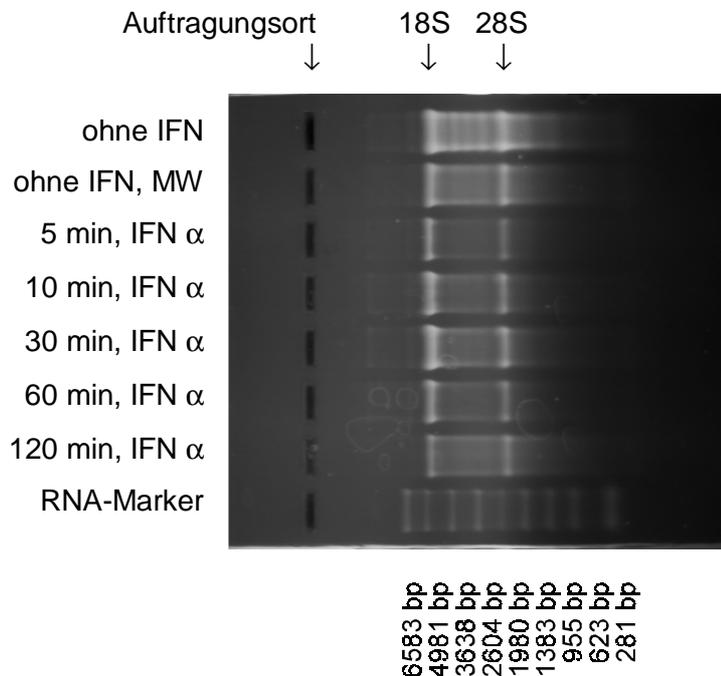


Abb. 8a: RNA-Gel für den Vergleich von fünf bis 120 Minuten mit Interferon α behandelten ARPE-19-Zellen

ARPE-19-Zellen wurden für die Dauer von 5, 10, 30, 60 und 120 min mit 500 Einheiten/ml Medium Interferon α behandelt, die RNA präpariert und Aliquots auf ein Agarosegel aufgetragen (Spuren 3 bis 7). Als Kontrolle dient die RNA aus unbehandelten ARPE-19-Zellen (Spur 1) sowie die RNA aus ARPE-19-Zellen, die nach 10 min frisches Medium erhielten (MW = Mediumwechsel; Spur 2). Parallel läuft ein RNA-Marker (Spur 8).

Zu erkennen sind Banden in Höhe der verschiedenen Anteile der ribosomalen RNA (18S, 28S).

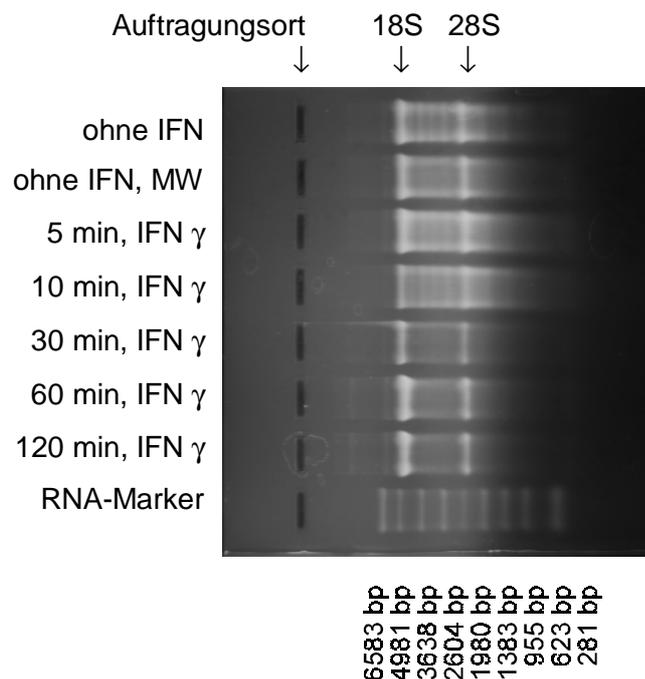


Abb. 8b: RNA-Gel für den Vergleich von fünf bis 120 Minuten mit Interferon γ behandelten ARPE-19-Zellen

ARPE-19-Zellen wurden für die Dauer von 5, 10, 30, 60 und 120 min mit 500 Einheiten/ml Medium Interferon γ behandelt, die RNA präpariert und Aliquots auf ein Agarosegel aufgetragen (Spuren 3 bis 7). Als Kontrolle dient die RNA aus unbehandelten ARPE-19-Zellen (Spur 1) sowie die RNA aus ARPE-19-Zellen, die nach 10 min frisches Medium erhielten (MW = Mediumwechsel; Spur 2). Parallel läuft ein RNA-Marker (Spur 8).

Zu erkennen sind Banden in Höhe der verschiedenen Anteile der ribosomalen RNA (18S, 28S).

Die RNA wurde mittels Northern blot-Methode von den Gelen auf Nylonmembranen übertragen.

Die beiden Northern blots mit der RNA aus für die Dauer von Minuten mit Interferon behandelten Zellen wurden eine Stunde lang in je 20 ml Pufferlösung vorhybridisiert und über Nacht in jeweils 15 ml Puffer mit 1.5 μ g (15 μ l einer Konzentration von etwa 100 ng/ μ l) Digoxigenin-markierter RNA des Collagenase-Gens hybridisiert. Wasch- und Detektionsschritte erfolgten nach Kapitel III.1.16. Ein Röntgenfilm wurde mit den detektierten Blots drei Stunden lang belichtet.

Zu erkennen ist zunächst eine starke Fehlhybridisierung der Digoxigenin-markierten RNA mit dem bei der Gelelektrophorese verwendeten RNA-Marker. Außerdem zeigen sich mehrere deutliche Banden, die auf weitere Fehlhybridisierungen, besonders im Bereich der rRNA hinweisen, von denen jedoch keine in ihrer Laufweite dem gesuchten Collagenase-Gen zugeordnet werden kann.

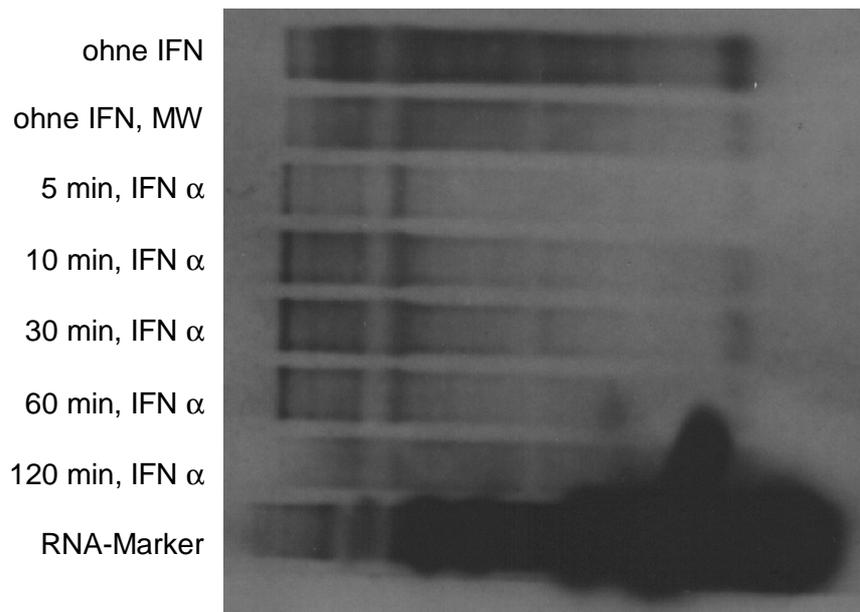


Abb 9a: Röntgenfilm für den Vergleich von fünf bis 120 Minuten mit Interferon α behandelten ARPE-19-Zellen

ARPE-19-Zellen wurden für die Dauer von 5, 10, 30, 60 und 120 min mit 500 Einheiten/ml Medium Interferon α behandelt, die RNA auf einem Agarosegel aufgetrennt (s. Abb. 8a), mittels Northern blot-Methode auf eine Nylonmembran übertragen und anschließend mit 1.5 μ g einer DIG-markierten RNA hybridisiert. Ein Röntgenfilm wurde mit der detektierten Membran drei Stunden lang belichtet. Spur 1: RNA aus unbehandelten Zellen, Spur 2: RNA aus Zellen ohne IFN-Behandlung, jedoch Mediumwechsel nach 10 min, Spuren 3 bis 7: IFN-behandelte Zellen, Spur 8: RNA-Marker.

Zu erkennen ist zunächst eine starke Fehlhybridisierung der Digoxigenin-markierten RNA mit dem bei der Gelelektrophorese verwendeten RNA-Marker. Außerdem zeigen sich mehrere deutliche Banden, die auf weitere Fehlhybridisierungen, besonders im Bereich der rRNA hinweisen, von denen jedoch keine in ihrer Laufweite dem gesuchten Collagenase-Gen zugeordnet werden kann.

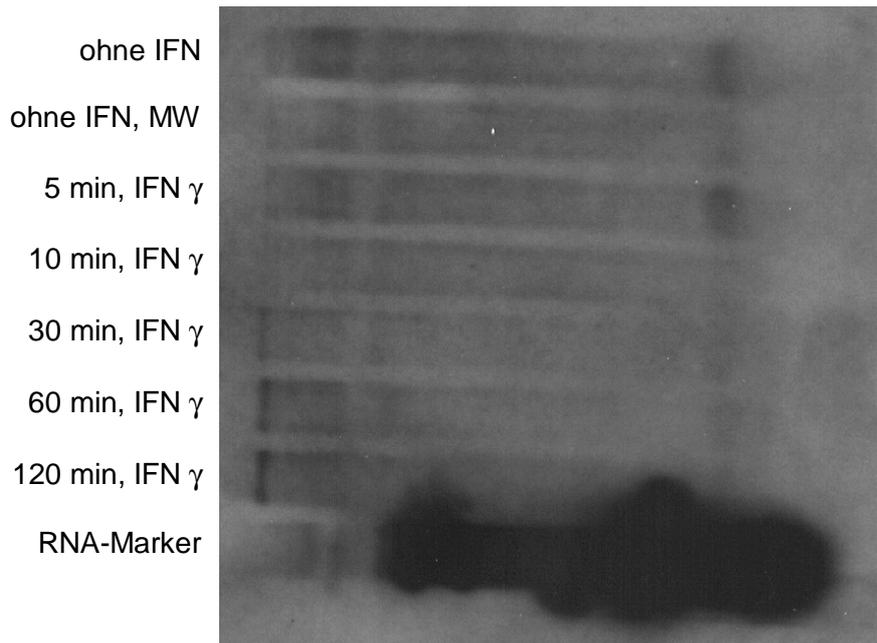


Abb. 9b: Röntgenfilm für den Vergleich von fünf bis 120 Minuten mit Interferon γ behandelten ARPE-19-Zellen

ARPE-19-Zellen wurden für die Dauer von 5, 10, 30, 60 und 120 min mit 500 Einheiten/ml Medium Interferon γ behandelt, die RNA auf einem Agarosegel (s. Abb. 8b) aufgetrennt, mittels Northern blot-Methode auf eine Nylonmembran übertragen und anschließend mit 1.5 μ g einer DIG-markierten RNA hybridisiert. Ein Röntgenfilm wurde mit der detektierten Membran drei Stunden lang belichtet. Spur 1: RNA aus unbehandelten Zellen, Spur 2: RNA aus Zellen ohne IFN-Behandlung, jedoch Mediumwechsel nach 10 min, Spuren 3 bis 7: IFN-behandelte Zellen, Spur 8: RNA-Marker.

Zu erkennen ist zunächst eine starke Fehlhybridisierung der Digoxigenin-markierten RNA mit dem bei der Gelelektrophorese verwendeten RNA-Marker. Außerdem zeigen sich mehrere deutliche Banden, die auf weitere Fehlhybridisierungen, besonders im Bereich der rRNA hinweisen, von denen jedoch keine in ihrer Laufweite dem gesuchten Collagenase-Gen zugeordnet werden kann.

Die RNA aus für die Dauer von Stunden mit Interferon α beziehungsweise Interferon γ behandelten ARPE-19-Zellen wurde vorschriftsmäßig denaturiert, auf ein Maxigel aufgetragen, und die Nukleinsäuren wurden 3,5 Stunden bei 80 Volt aufgetrennt.

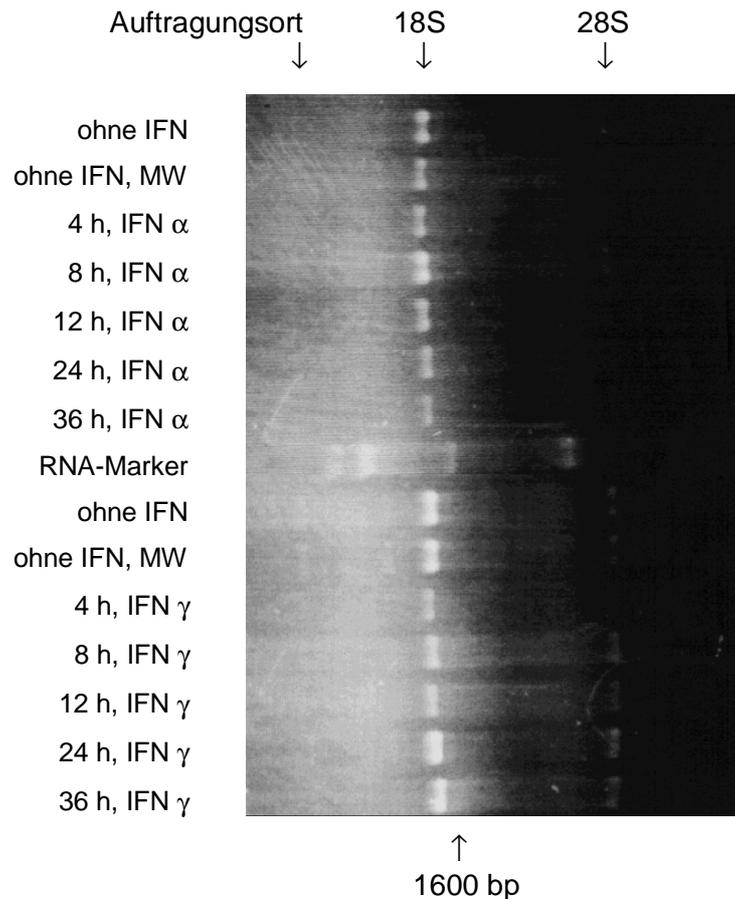


Abb. 10: RNA-Gel für den Vergleich von vier bis 36 Stunden mit Interferon α bzw. Interferon γ behandelten Zellen

ARPE-19-Zellen wurden für die Dauer von 4, 8, 12, 24 und 36 h mit 500 Einheiten/ml Medium Interferon α bez. γ behandelt, die RNA präpariert und Aliquots auf ein Agarosegel aufgetragen (Spuren 3 bis 7: IFN α -Behandlung, Spuren 11 bis 15: IFN γ -Behandlung). Als Kontrolle dient die RNA aus unbehandelten ARPE-19-Zellen (Spuren 1 und 9) sowie die RNA aus ARPE-19-Zellen, die nicht mit IFN behandelt wurden, jedoch nach 4 h frisches Medium erhielten (MW = Mediumwechsel; Spuren 2 und 10). Parallel läuft ein RNA-Marker (Spur 8).

Zu erkennen sind Banden in Höhe der verschiedenen Anteile der ribosomalen RNA (18S, 28S).

Die aufgetrennte RNA wurde über Nacht vom Gel auf eine Nylonmembran mittels Northern blot übertragen. Der Northern blot mit der RNA aus für die Dauer von Stunden mit Interferon behandelten Zellen wurde eine Stunde lang in 35 ml Pufferlösung vorhybridisiert und ebenfalls über Nacht in 25 ml Puffer mit 2.5 μ g (25 μ l

einer Konzentration von 100 ng/μl) Digoxigenin-markierter RNA des Collagenase-Gens hybridisiert. Nach Waschen und Detektion wurde ein Röntgenfilm mit dem Blot einmal eine und dann nochmals drei Stunden lang belichtet. Auch hier finden sich lediglich Hybridisierungsbanden im Bereich der rRNA, nicht jedoch auf Höhe der RNA mit der genetischen Information des Collagenase-Gens.

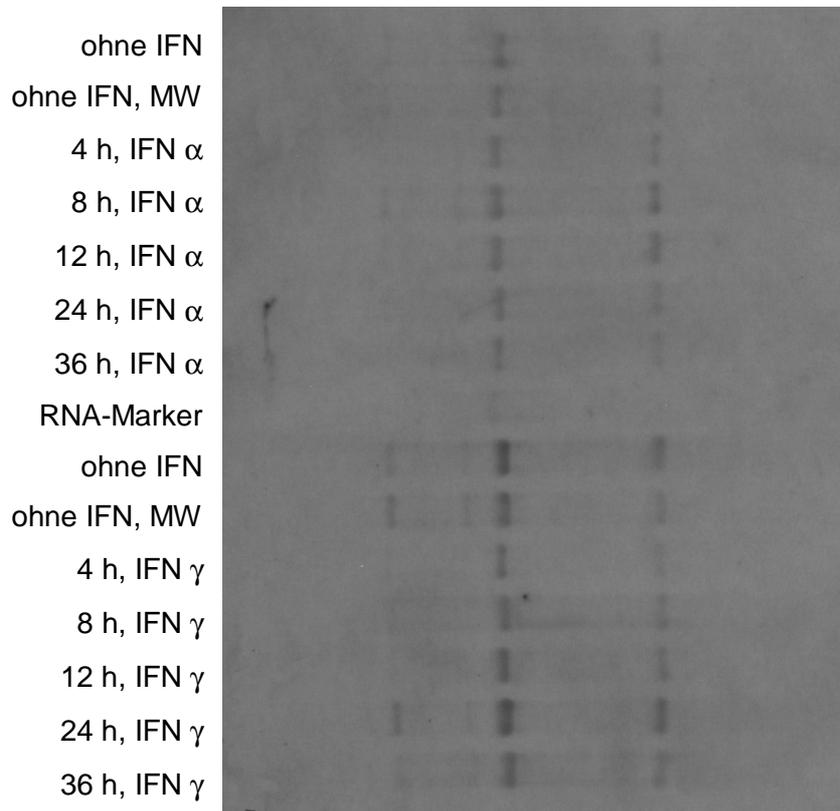


Abb. 11: Röntgenfilm für den Vergleich von vier bis 36 Stunden mit Interferon α beziehungsweise Interferon γ behandelten Zellen

ARPE-19-Zellen wurden für die Dauer von 4, 8, 12, 24 und 36 h mit 500 Einheiten Interferon/ml Medium α bez. γ behandelt, die RNA auf ein Agarosegel aufgetragen (s. Abb. 11), mittels Northern blot-Methode auf eine Nylonmembran übertragen und mit 2.5 μ g DIG-markierter RNA hybridisiert. Spuren 1 und 9: RNA aus unbehandelten Kontrollzellen, Spuren 2 und 10: RNA aus nicht mit IFN behandelten, jedoch einem Mediumwechsel nach 4 h unterzogenen Zellen, Spuren 3 bis 7: IFN α -Behandlung, Spur 8: RNA-Marker, Spuren 11 bis 15: IFN γ -Behandlung.

Es finden sich lediglich Hybridisierungsbanden im Bereich der rRNA, nicht jedoch auf Höhe der RNA mit der genetischen Information des Collagenase-Gens.

4.3 Untersuchung des Stromelysin-Gens

4.3.1 Untersuchung des Stromelysin 1-Gens in ARPE 19-Zellen mit der RT-PCR-Methode

Für die Untersuchung der Metalloproteinase Stromelysin 1 gingen wir auf die weitaus sensiblere Methode der RT-PCR (Reverse-Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion) über. Bei dieser Methode wird die RNA zunächst mittels der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben und diese dann in der Polymerase-Kettenreaktion vervielfältigt. Dadurch lassen sich auch ursprünglich sehr geringe Mengen nachweisen. Da Tumor Nekrose Faktor Metalloproteinasen induzieren kann, wurden ARPE19-Zellen mit und ohne TNF-Behandlung verwendet.

Es wurde die Gesamt-RNA aus ARPE 19-Zellen mit und ohne TNF-Behandlung unter Verwendung von Oligo-dT-Primern nach Vorschrift revers transkribiert. Die erhaltene cDNA wurde in vierzig Zyklen der Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert, wobei parallel verschiedene Konzentrationen an $MgCl_2$ verwendet wurden. Anschließend wurde das Ergebnis anhand einer Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

Auch mit dieser Methode konnte die genetische Information für die Metalloproteinase Stromelysin in der ARPE-19-Zelle nicht nachgewiesen werden (Foto der Gelelektrophorese nicht abgebildet).

Zur Überprüfung der Methoden wurden anschließend sowohl menschliche Fibroblasten als auch menschliche Gliomazellen zum Nachweis der genetischen Information der Metalloproteinase Stromelysin herangezogen. In beiden Zellsystemen ist es bereits gelungen, Stromelysin nachzuweisen [46;53].

4.3.2 Nachweis des Stromelysin 1-Gens in humanen Fibroblasten

Während bei parallel in der gleichen Versuchsreihe untersuchten ARPE-19-Zellen das Stromelysin 1-Gen nicht nachgewiesen wurde, konnte die genetische Information für die Metalloproteinase Stromelysin 1 mit der RT-PCR-Methode in humanen Fibroblasten nachgewiesen werden.

Es wurde nach folgendem Pipettierschema gearbeitet (alle Angaben in μl):

Ansatz Nr.	1	2	3	4
10x PCR	10	10	10	10
25nM MgCl ₂	14 (3.5 mM)	14	-	12 (3.0 mM)
dNTP	2	2	2	2
F-Primer	0.5	1	0.5	-
R-Primer	0.5	1	0.5	-
cDNA	5.2 (= 200 ng)	7.9 (= 300 ng)	5.2	5.2
DEPC-H ₂ O	65.3	61.6	79.3	68.3
TAQ	2.5	2.5	2.5	2.5
Mineralöl	+	+	+	+

Das PCR-Produkt wurde mittels Gelelektrophorese nachgewiesen. Es ist 573 bp lang [53]. Es wurden je 15 µl PCR-Probe mit 3 µl Gelladepuffer auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen und die Nukleinsäuren bei 100 Volt 90 min lang aufgetrennt.

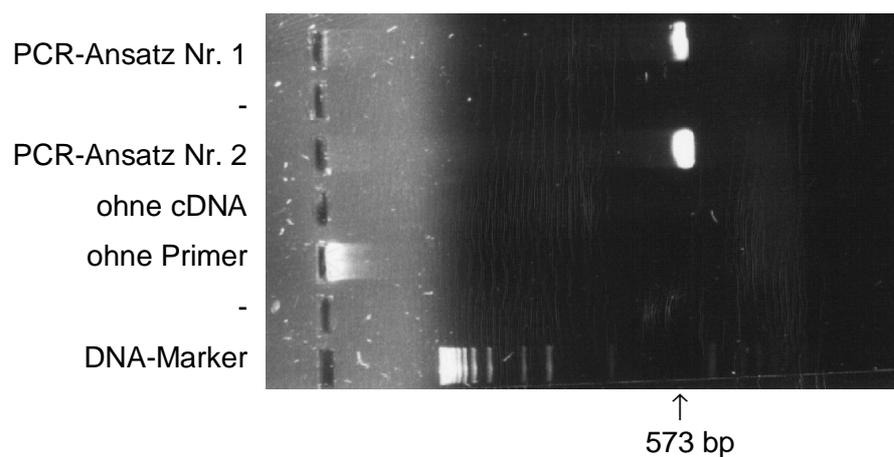


Abb. 14: Nachweis der DNA der Metalloproteinase Stromelysin 1 in humanen Fibroblasten

Es wurde eine RT-PCR aus humanen Fibroblasten durchgeführt (Pipettierschema s.o.). Auf Spur 1 wurde PCR-Probe aus Ansatz Nr. 1 aufgetragen, bei dem 200 ng RNA in die RT-PCR eingesetzt worden waren. Auf Spur 3 wurde ein Aliquot der cDNA aus Ansatz Nr. 2 aufgetragen, bei dem 300 ng RNA eingesetzt worden waren. Bei beiden Spuren ist auf Höhe der genetischen Information von Stromelysin 1 (571 bp) eine Bande sichtbar. Als Negativkontrolle dienen ein Versuchsansatz, bei dem keine RNA in die RT-PCR eingesetzt wurden (Spur 4), sowie ein Ansatz ohne

Amplifizierungsprimer (Spur 5). Bei Spur 5 sind Reste in der Auftragungstasche zu erkennen, dennoch werden beide Kontrollen als negativ bewertet.

4.3.3 Nachweis des Stromelysin 1-Gens in menschlichen Gliomazellen

In einem weiteren Experiment wurden parallel die ARPE-19-Zelllinie und die aus humanen Gliomazellen isolierte Zelllinie U 251 mit der RT-PCR-Methode auf Stromelysin 1 untersucht. Da die genetische Information für Stromelysin 1 in menschlichen Gliomazellen bereits nachgewiesen werden konnte [53], diente diese Zelllinie als Positivkontrolle.

Folgendes Pipettierschema wurde verwendet (alle Angaben in µl):

	ARPE-19-Zelllinie					U 251-Zelllinie				
Ansatz Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
10x PCR	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
25nM MgCl₂	-	7	7	7	7	-	7	7	7	7
dNTP	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
F-Primer	0.5	0.5	0.5	0.5	-	0.5	0.5	0.5	0.5	-
R-Primer	0.5	0.5	0.5	0.5	-	0.5	0.5	0.5	0.5	-
cDNA	2.77 (100 ng)	2.77	5.55 (200 ng)	-	2.77	5 (100 ng)	5	10 (200 ng)	-	5
DEPC-H₂O	38.98	31.98	29.20	34.75	32.98	36.75	29.75	24.75	34.75	30.75
TAQ	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
Mineralöl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Die Versuchsansätze ohne MgCl₂ (Nr. 1), ohne cDNA (Nr. 4) beziehungsweise ohne Primer (Nr. 5) dienten als Negativkontrolle. Es wurden jeweils 5 pmol des Stromelysin 1-Primers eingesetzt.

Nach Durchführung der PCR wie in „Material und Methoden“ beschrieben, wurden je 15 µl der Proben zusammen mit je 3 µl Gelladepuffer auf 1 %ige Agarosegele aufgetragen und die Gele bei 85 Volt 90 min lang laufen gelassen. Es zeigte sich folgendes Ergebnis:

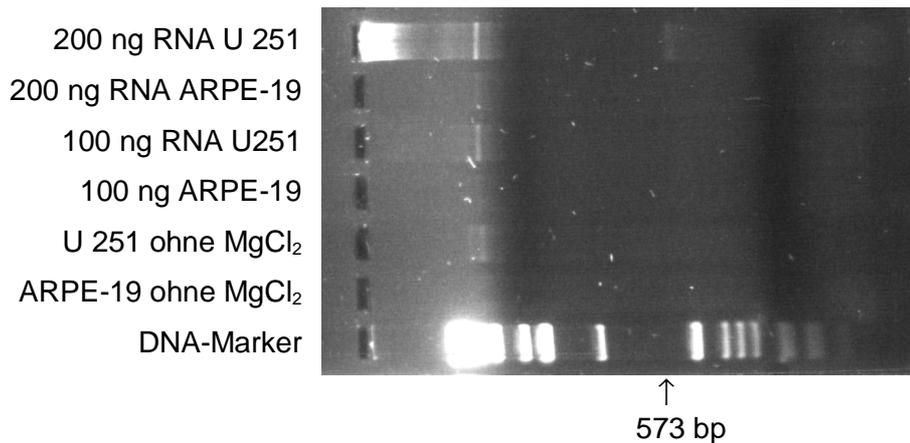


Abb. 15: Nachweis der RNA der Metalloproteinase Stromelysin 1 in humanen Gliomazellen der Zelllinie U 251

Die ARPE-19-Zelllinie und die aus humanen Gliomazellen isolierte Zelllinie U 251 wurden mit der RT-PCR-Methode auf Stromelysin 1 untersucht. Auf Spur 1 wurde DNA aus Versuchs-ansatz Nr. 8 aufgetragen, in den 200 ng RNA aus U 251-Zellen eingesetzt worden waren. Im Vergleich dazu auf Spur 2 DNA aus PCR-Ansatz Nr. 3, in den 200 ng RNA aus ARPE-19-Zellen eingesetzt worden waren. Entsprechend Spuren 3 und 4 mit jeweils 100 ng eingesetzter RNA. Banden 5 und 6: Negativkontrolle (PCR-Ansatz Nr. 6 bzw. Nr. 1, ohne MgCl). Auf Spur 7 wurde ein DNA-Marker aufgetragen. Während in der menschlichen Gliomazelle U 251 bei Versuchsansatz Nr. 3 auf Höhe der mRNA für Stromelysin 1 (573 bp) eine scharfe Bande sichtbar ist, ist auch in dieser Versuchsreihe die mRNA für Stromelysin 1 in der humanen Pigmentepithelzelle ARPE-19 nicht nachweisbar.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Im Zusammenhang mit der Frage, welche Gene am Vorgang der Apoptose in Zellen der menschlichen Netzhaut beteiligt sind, wurden in der vorliegenden Arbeit die Metalloproteinasen Stromelysin und Collagenase in der humanen ARPE-19-Zelllinie untersucht. Hierzu erfolgten zunächst Versuche, die genetische Information der Metalloproteinasen in unbehandelten ARPE-19-Zellen auf mRNA-Ebene nachzuweisen, um gegebenenfalls die Untersuchung anzuschließen, inwiefern eine Behandlung der Zellen mit humanen Interferonen α und γ die Genexpression beeinflusst.

Für die Untersuchung der Metalloprotease Collagenase diente die Northern-blot-Analyse. Zunächst wurde ein Plasmid mit der genetischen Information des Collagenase-Gens präpariert, aus dessen DNA durch in vitro-Transkription Digoxigenin-markierte antisense-RNA gewonnen wurde. Diese wurde dann für die RNA-RNA-Hybridisierung mit der durch LiCl-Fällung aus ARPE-Zellen gewonnenen RNA eingesetzt. Da sich die nach der Detektion erhaltenen Hybridisierungs-Signale nicht eindeutig der genetischen Information des Collagenase-Gens zuordnen ließen, wurde anschließend versucht, die mRNA-Menge aus der ARPE-19-Zelllinie durch eine fakultative Interferon-induzierte Genstimulation über die Nachweisgrenze zu erhöhen. Hierzu wurden die ARPE-19-Zellen einer sogenannten Kinetik der Interferonbehandlung unterzogen. Es wurde zunächst die RNA aus Zellen präpariert, die eine Dauer von vier, acht, 12, 24 bzw. 36 Stunden mit Interferon α bzw. γ behandelt wurden. Eine zweite Kinetik wurde für die Zeitpunkte fünf, zehn, 30, 60 und 120 Minuten nach Interferongabe erstellt und ebenfalls die RNA aus den so behandelten Zellen präpariert. Als Kontrolle dienten jeweils unbehandelte ARPE-19-Zellen sowie Zellen, die zum Zeitpunkt vier Stunden bzw. fünf Minuten mit frischem Nährmedium versetzt wurden, um auszuschließen, daß allein ein Mediumwechsel eine Geninduktion bewirkt.

Bei beiden Versuchsreihen zeigte sich auch nach dem Versuch einer Geninduktion durch Interferone nach der Hybridisierung mit der Digoxigenin-markierten antisense-RNA kein Signal im Bereich der dem Collagenase-Gen entsprechenden Laufweite.

Da bei der Untersuchung des Collagenase-Gens ein Nachweis der Metalloprotease in der ARPE 19-Zelle mit dem beschriebenen Versuchsaufbau nicht erfolgt war, wurde

für die Untersuchung der Metalloproteinasen aus der Stromelysin-Familie auf eine andere Methode zurückgegriffen. Nach einigen Vorversuchen mit Stromelysin 2 wurde der Schwerpunkt der Untersuchung auf das Stromelysin 1-Gen gelegt. Hierbei wurde auf die weitaus sensiblere Methode der RT-PCR übergegangen, bei der auch ursprünglich sehr geringe Mengen an Nukleinsäuren nachgewiesen werden können.

Da bekannt ist, daß Tumor Nekrose Faktor (TNF) die Genproduktion von Metalloproteinasen induzieren kann [3], wurden ARPE 19-Zellen mit und ohne TNF-Stimulation unter Verwendung von Oligo-dT-Primern revers transkribiert. Die erhaltene cDNA wurde in 40 Zyklen der PCR amplifiziert. Anschließend wurde das Ergebnis anhand einer Agarosegelelektrophorese überprüft. Auch mit dieser sensiblen Methode konnte die untersuchte Metalloproteinase Stromelysin 1 nicht nachgewiesen werden.

Zur Überprüfung der Methoden wurden sowohl menschliche Fibroblasten als auch menschliche Gliomazellen zum Nachweis der genetischen Information der Metalloproteinase Stromelysin 1 herangezogen. In beiden Zellsystemen ist es bereits gelungen, Stromelysin nachzuweisen [46; 53], weshalb diese als Positivkontrollen eingesetzt werden konnten.

Hierbei war der Nachweis mit der RT-PCR-Methode für das Stromelysin 1-Gen in der ARPE 19-Zelllinie negativ, in parallel durchgeführten Versuchsreihen in humanen Fibroblasten hingegen positiv. In einer weiteren Versuchsreihe wurden parallel die ARPE 19-Zelllinie und die aus humanen Gliomazellen isolierte Zelllinie U251 mit der rT-PCR-Methode auf Stromelysin 1 untersucht. Während die genetische Information der untersuchten Metalloproteinase in der Zelllinie U251 nachweisen ließ, war sie in der ARPE-19-Zelllinie negativ, ebenso in den durchgeführten Negativkontrollen, was die korrekte Durchführung der Versuchsreihen bestätigte.

6 DISKUSSION

Ophtalmologische Krankheitsbilder, die mit Degeneration oder erblichen Dystrophien der Retina einhergehen, führen in vielen Fällen zur Erblindung und stellen daher ein großes Problem in der Augenheilkunde dar. Um die erst bruchstückhaften Erkenntnisse bezüglich der Pathogenese der Erkrankungsgruppe der Netzhautdegenerationen zu erweitern und somit eventuell neue Maßnahmen zur Prävention und Therapie entwickeln zu können, wurde die lichtinduzierte Apoptose in der Netzhaut als geeignetes Modell zur Untersuchung dieser Fragestellungen eingesetzt [43]. Ähnlich weitverbreitet wie der lichtinduzierte Retina-Schaden sind Tiermodelle menschlicher vererbbarer Netzhaut-Dystrophien. Die Untersuchung beider, Degeneration und Dystrophien, hat in der letzten Zeit einen Durchbruch erfahren, als der apoptotische Zelltod als Korrelat des Zellverlustes entdeckt wurde [39]. Während es gute Fortschritte in den Erkenntnissen über die Genmutationen, die zu retinalen Dystrophien führen, gab, sind die Schritte, die zwischen der Genmutation und dem funktionellen Defizit in der Zelle liegen sowie die Signalketten, die letztlich zur Entscheidung zum Zelltod führen, noch relativ unklar [42].

Die Gene, die in der Netzhaut zum apoptotischen Zelltod führen, sind erst unzureichend erforscht. Im Zentralnervensystem spielen die Proto-Onkogene c-fos und c-jun bei der Regulation der Apoptose eine Rolle. C-fos und c-jun sowie die Mitglieder ihrer Proteinfamilie bilden zusammen den Transkriptionsfaktor AP-1, der als molekularer Vermittler des Zelltodes betrachtet wird. AP-1 Proteine führen womöglich nicht direkt zum Zelltod, sondern nehmen an der Aktivierung des Basisprogrammes teil, das zur Apoptose führt. [42]

Die Forschungsgruppe um Frau Dr. Remé in Zürich untersuchte die Rolle von c-fos im Vorgang der lichtinduzierten Apoptose und fand heraus, daß c-fos knockout-Mäuse einen geringeren Schaden durch Apoptose erlitten als Kontrollmäuse des Wildtypes [17]. Die retinale Entwicklung der knockout-Mäuse schien nicht gestört zu sein [42]. Während c-fos also eine essentielle Rolle für die lichtinduzierte Apoptose spielt, zeigten weitere Untersuchungen, daß c-fos nicht allgemein als universeller Regulator für retinale Apoptose angesehen werden kann [16].

Weiterhin unklar ist die Frage, welche Rolle die Familie der Cytokine im Zusammenhang mit dem Vorgang der Apoptose im retinalen Pigmentepithel spielt. Zumindest im Fall der lichtinduzierten Apoptose scheinen Cytokine freigesetzt zu werden [43]. Man weiß, daß das Pigmentepithel, das strukturell und funktionell eng mit

der Retina verbunden ist, in der Lage ist, auf bestimmte Stimulation verschiedene Cytokine freizusetzen [20].

Im Zusammenhang mit der Frage, welche Gene die molekulargenetische Grundlage für den Vorgang der Apoptose in Zellen der menschlichen Netzhaut bilden, wurde in dieser Arbeit die Frage untersucht, ob in der humanen Pigmentepithelzelllinie ARPE-19 die Metalloproteinasen Stromelysin und Collagenase produziert werden und ob die Genexpression dieser Metalloproteinasen durch eine Behandlung der Zellen mit humanen Interferonen stimuliert werden kann.

Der Nachweis sollte auf der mRNA-Ebene erfolgen. Es wurden zwei Methoden für den Nachweis verwendet. Zunächst diente die Northern-blot-Analyse, wobei für die Hybridisierung Digoxigenin-markierte antisense-RNA verwendet wurde, die durch in vitro-Transkription gewonnen wurde. Außerdem erfolgte der Versuch, die mRNA der untersuchten Metalloproteinasen durch die weitaus sensiblere Methode der RT-PCR nachzuweisen.

Als Modell diente die ARPE-19-Zelle, eine 1996 von Dunn et al. isolierte Zelllinie, die sich durch ihre epitheliale Morphologie und rasche Proliferationsrate von anderen primären RPE-Kulturen unterscheidet [10]. Die Zelllinie zeichnet sich laut den Ergebnissen der Arbeitsgruppe Dunn et al. durch strukturelle und funktionelle Eigenschaften aus, die für retinale Pigmentepithelzellen in vivo charakteristisch sind und ist daher geeignet für in vitro Untersuchungen über die Physiologie des retinalen Pigmentepithels [10]. Als Kontrolle wurden humane Fibroblasten verwendet, in denen Kurkinen et al. bereits die Regulierung der Transkription menschlichen Stromelysins untersuchten [40], sowie menschliche Gliomazellen, in denen Wagner et al. die Expression von Metalloproteinasen in der Gegenwart von Interleukin 10 studierten [53].

Mit der Northern-blot-Analyse konnte in der ARPE-19-Zelle die mRNA der Metalloproteinase Collagenase nicht nachgewiesen werden. Es gibt zwei Überlegungen, die diese Ergebnisse erklären könnten: Entweder ist die Menge der mRNA unter der Nachweisgrenze, oder aber es wird in der ARPE-19-Zelle die genetische Information der Metalloproteinase Collagenase nicht exprimiert. Der Versuch, eine eventuell sehr geringe mRNA-Menge durch Interferon-Behandlung der retinalen Pigmentepithelzellen über die Nachweisgrenze zu erhöhen, erbrachte ebenfalls ein negatives Ergebnis: Auch in mit Interferon α und in mit Interferon γ

behandelten ARPE-19-Zellen konnte Collagenase nicht nachgewiesen werden. Daher rückt die Möglichkeit in den Vordergrund, daß in der ARPE-19-Zelle Collagenase nicht produziert wird.

Im nächsten Schritt wurde auf die weitaus sensiblere Methode der RT-PCR übergegangen. Hierbei wurde die Untersuchung der Metalloproteinase Stromelysin 1 in den Vordergrund gestellt. Während Stromelysin 1 in den Kontrollzellen (menschliche Fibroblasten sowie menschliche Gliomazellen) nachgewiesen werden konnte, was einen Fehler in der Methodik ausschließt, konnte auch mit der RT-PCR-Methode in der ARPE-19-Zelle Stromelysin 1 nicht nachgewiesen werden.

Im Rahmen einer weiteren Doktorarbeit parallel durchgeführte Versuche, in der gleichen Zelllinie die mRNA des TIMP-3-Proteins, eines Inhibitors von Metalloproteinasen, nachzuweisen, zeigten ebenfalls, daß die ARPE-19-Zelle offensichtlich nicht mehr zur Expression dieses Gens fähig ist. Unterstrichen wurde diese These dadurch, daß der Nachweis der TIMP-3-RNA in einer weiteren Zelllinie humaner retinaler Pigmentepithelzellen, die nur einer geringen Passagezahl (25 Passagen) unterzogen wurde, möglich war. Dies legt die Vermutung nahe, daß die ARPE-19-Zelle durch die Anzahl der Passagen, der sie während der Zellkultur unterzogen wurde, zwar nicht immortalisierte, jedoch eine gewisse Zahl von Genen abschaltete, zu denen auch die Gene der hier untersuchten Metalloproteinasen Collagenase und Stromelysin sowie das Gen für deren Inhibitor TIMP-3 gehören, oder daß die Zelllinie nicht den komplett identischen Chromosomensatz einer originären retinalen Pigmentepithelzelle besitzt. Dunn et al. konnten zwar in ARPE-19-Zellen der elften Passage einen kompletten diploiden Chromosomensatz menschlichen Ursprungs mit 46 Chromosomen nachweisen, berichtet aber auch über Veränderungen an den Chromosomen 8 und 19 [10]. Die ARPE-19-Zelle wurde als zum Studium der Regulation RPE-spezifischer Gen-Expression geeignet eingestuft [10].

Die Tatsache, daß hochspezialisierte Zellen bei oftmaligem Passagieren ihre spezialisierten Eigenschaften verlieren, kann in der Forschung häufig beobachtet werden. Offenbar ist die in Kultur gehaltene ARPE-19-Zelle eine in ihrer transkriptionellen Aktivität extrem reduzierte Zelle, bei der auch die Transkription der Metalloproteinasen Stromelysin und Collagenase sowie von deren Inhibitor TIMP-3 abgeschaltet ist.

7 ANHANG

7.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AMD	Altersabhängige Makuladegeneration
Amp R	Ampicillinresistenz
AP-1	activator protein-1
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
Coll	Collagenase
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco Minimal Essential Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dr.	Doktor
E. coli	Escherichia coli
ECL	enhanced chemieluminization
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii
g	Gramm
h	Stunde(n)
hu.	human
IFN	Interferon
IL	Interleukin
kbp	Kilobasenpaare
l	Liter
LiCl	Lithiumchlorid
M	molar
MEM	Minimal Essential Medium
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid

min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	millimolar
MMP	Matrix Metalloproteinase
mRNA	messenger RNA
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Nr.	Nummer
pbs	bluescript-Vektor
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pmol	Picomol
Prof.	Professor
RNA	Ribonukleinsäure
RPE	retinales Pigmentepithel
rRNA	ribosomale RNA
RT-PCR	Reverse-Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion
s.	siehe
sec	Sekunden
SL	Stromelysin
sog.	sogenannte
stat	signal transducer and activator of transcription
TIMP	tissue-derived inhibitor of metalloproteinases
TNF	Tumor-Nekrose- Faktor
UV	Ultra-Violett
V	Volt
z. B.	zum Beispiel

7.2 Literaturverzeichnis

1. **Bird AC.** (1995): *Retinal photoreceptor dystrophies. LI. Edward Jackson Lecture.* Am J Ophthalmol 119: 543-562
2. **Boone TC., Johnson MJ., DeClerck YA., Langley KE.** (1990): *cDNA cloning and expression of a metalloproteinase inhibitor related to tissue inhibitor of metalloproteinase.* Proc Natl Acad Sci USA 87: 2800-2804
3. **Borden P., Heller RA.** (1997): *Transcriptional control of matrix metalloproteinases and the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases.* Crit Rev Eukaryot Gene Expr 7: 159-178
4. **Brenner CA., Adler RR., Rappolee DA., Pedersen RA., Werb Z.** (1989): *Genes for extracellular matrix-degrading metalloproteinases and inhibitor, TIMP, are expressed during early mammalian development.* Genes Dev 3: 848-859
5. **Buddecke E.:** *Grundriß der Biochemie für Studierende der Medizin, Zahnmedizin und Naturwissenschaften, 9., neubearbeitete Auflage,* de Gruyter New York, 1994: S.121
6. **Chang GQ., Hao Y., Wong F.** (1993): *Apoptosis: Final common pathway of photoreceptor death in rd, rds, and rhodopsin mutant mice.* Neuron 11: 595-605
7. **Collins J. F., Augustin A. J.:** *Augenheilkunde,* Springer-Verlag Berlin/ Heidelberg/ New York, 1996
8. **Darnell JEJ., Kerr IM., Stark GM.** (1994): *Jak-stat pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins.* Science 264: 1415-1421

9. **DeClerck YA., Yean T-D., Ratzkin BJ., Lu HS., Langley KE.** (1989): *Purification and characterization of two related but distinct metalloproteinase inhibitors secreted by bovine aortic endothelial cells.* J Biol Chem 264(29): 17445-17454
10. **Dunn KC., Aotaki-Keen AE., Putkey FR., Hjelmeland LM.** (1996): *ARPE-19, a human retinal epithelial cell line with differentiated properties.* Exp Eye Res 62: 155-169
11. **Eagle H.** (1959): *Amino acid metabolism in mammalian cell cultures.* Science 130: 432-437
12. **Feeney-Burns L., Hildebrandt ES, S. E** (1984) *Aging human RPE: morphometric analysis of macular, equatorial, and peripheral cells.* Invest Ophthalmol Vis Sci 25: 195-200
13. **Frisch SM., Ruley HE.** (1987): *Transcription from the stromelysin promoter is induced by interleukin-1 and repressed by dexamethasone.* J Biol Chem 262: 16300-16304
14. **Gack S., Vallon R., Schaper J., Rütther U., Angel P.** (1994): *Phenotypic alterations in fos-transgenic mice correlate with changes in fos/jun-dependent collagenase type I expression.* J Biol Chem 269: 10363-10369
15. **Grehn F.:** *Augenheilkunde.* 27. Auflage, Springer-Verlag Berlin/ Heidelberg/ New York, 1998
16. **Hafezi F., Abegg M., Grimm C., Wenzel A., Munz K., Stürmer J., Farber DB., Remé CE.** (1998): *Retinal degeneration in the rd mouse in the absence of c-fos.* Invest Ophthalmol Vis Sci 39: 2239-2244
17. **Hafezi F., Steinbach JP., Marti A., Munz K., Wang ZQ., Wagner EF., Aguzzi A., Remé CE.** (1997): *The absence of c-fos prevents light-induced apoptotic cell death of photoreceptors in retinal degeneration in vivo.* Nature Medicine 3: 346-349

18. **Harris ED. Jr., Welgus HG., Krane SM.** (1984) *Collagen Relat Res* 4: 493-512

19. **Hayakawa T., Yamashita K., Tanzawa K., Uchijima E., Iwata K.** (1992): *Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum.* *FEBS Lett* 298(1): 29-32

20. **Jaffe GL., Roberts WL., Wong HL., Yurochko AD., Cianciolo GJ.** (1995): *Monocyte-induced expression in cultured human retinal pigment epithelial cells.* *Exp Eye Res* 60: 533-543

21. **Johnson HM., Bazer FW., Szenté BE., Jarpe MA.** (1994): *Wirkungsweise von Interferonen.* *Spektrum der Wissenschaft*, Juli 1994: 78-85

22. **Jones SE., Jomary C., Neal MJ.** (1994): *Expression of TIMP-3 mRNA is elevated in retinas effected by simplex retinitis pigmentosa.* *FEBS Lett.* 352: 171-174

23. **Jungwirth C. und Remé CE.** (1997): *Pathogenese von Degenerationen und Dystrophien der Netzhaut; Das Interferonsystem und Genregulation des Zelltores am Modell der lichtinduzierten Apoptose und in Tiermodellen der Retinitis Pigmentosa.* Forschungsantrag

24. **Kerr LD., Olashaw NE., Matrisian LM.** (1988): *Transforming growth factor β 1 and cAMP inhibit transcription of epidermal growth factor- and oncogene-induced transin RNA.* *J Biol Chem* 263: 16999-17005

25. **Klinke R., Silbernagl S.:** *Lehrbuch der Physiologie*, Georg Thieme Verlag Stuttgart/ New York, 1994

26. **Knippers R.:** *Molekulare Genetik*, 7. durchgesehene und korrigierte Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart/ New York, 1995: S.464

27. **Kohase M., Zhang Y., Lin J., Yamazaki S., Sehgal PB., Vilcek J.** (1988): *Interleukin-1 can inhibit interferon- β synthesis and its antiviral action: comparison with tumor necrosis factor.* J Interfer Res 8: 559-570

28. **Kroemer G., Petit P., Zamzami N., Vayssière JL., Mignotte B.** (1995): *The biochemistry of programmed cell death.* FASEB 9: 1277-1287

29. **Leco KJ., Khokha R., Pavloff N., Hawkes SP., Edwards DR.** (1994): *Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) is an extracellular matrix-associated protein with a distinctive pattern of expression in mouse cells and tissues.* J Biol Chem 269: 9352-9360

30. **Leiber S.:** *Die klinischen Syndrome*, Band 1, Urban & Schwarzenberg, 1990

31. **Lewin B.:** *Molekularbiologie der Gene*, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg/ Berlin, 1998: S.904

32. **Lippert H.:** *Lehrbuch Anatomie*, 3. Auflage, Urban&Schwarzenberg Verlag, München

33. **Matrisian LM.** (1990): *Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling.* Trends Genet 6: 121-125

34. **Matrisian LM., Gleichhaus N., Gesnel MC., Breathnach R.** (1985): *Epidermal growth factor and oncogenes induce transcription of same cellular mRNA in rat fibroblasts.* EMBO J 4: 1435-1440

35. **McDonnell SE., Kerr LD., Matrisian LM.** (1990): *Epidermal growth factor stimulation of stromelysin mRNA in rat fibroblasts requires induction of proto-oncogenes c-fos and c-jun and activation of protein kinase C.* Molecular and cellular biology 8: 4284-4293

36. **Murphy G., Cawston T., Reynolds J.** (1981): *An inhibitor of collagenase from human amniotic fluid: purification, characterization and action on metalloproteinases.* Biochem J 195: 167-170

37. **Okada Y., Nagase H., Harris ED. Jr.** (1986): *A metalloproteinase from human rheumatoid synovial fibroblasts that digests connective tissue matrix components.* J Biol Chem 261: 14245-14255

38. **Pfeffer LM., Murphy JS., Tamm I.** (1979): *Interferon effects on the growth and division of human fibroblasts.* Exp Cell Res 121: 111-120

39. **Portera-Cailliau C., Sung CH., Nathans J., Adler R.** (1994): *Apoptotic photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa.* Proc Natl Acad Sci USA 91: 974-978

40. **Quinones S., Saus J., Otani Y., Harris ED. jr, Kurkinen M.** (1989): *Transcriptional regulation of human stromelysin.* J Biol Chem 264: 8339-8344

41. **Reed JC.** (1994): *Mini-review: cellular mechanisms of disease series. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death.* J Cell Biol 124: 1-6

42. **Remé CE., Grimm C., Hafezi F., Wenzel A., Williams TP.** (1999): *Apoptosis in the retina: The silent death of vision.* News in Physiological Sciences

43. **Remé CE., Hafezi F., Marti A., Wenzel A.** (1998): *Light damage to retina and pigment epithelium.* In: The retinal pigment epithelium, current aspects of function and disease., herausgegeben von Marmor, MF., und Wolfensberger TJ., Oxford: Oxford University Press

44. **Romanic AM., Madri Ja.** (1994): *Extracellular matrix-degrading proteinases in the nervous system.* Brain Pathol 4: 145-156

45. **Sambrook, Fritsch, Maniatis** (1989): *Molecular cloning. A laboratory manual.* 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

46. **Saus J., Quinones S., Otani Y., Nagase H., Harris ED. Jr., Kurkinen M.** (1988): *The complete primary structure of human matrix metalloproteinase-3.* J Biol Chem 263: 6742-6745

47. **Schmid TM., Mayne R., Jeffrey JJ., Linsenmayer TF.** (1986): *Type X collagen contains two cleavage sites for a vertebrate collagenase.* J Biol Chem 261: 4184-4189
48. **Sciavolino P., Lee TH., Vilcek J.** (1994): *Interferon- β induces metalloproteinase mRNA expression in human fibroblasts; role of activator protein-1.* J Biol Chem 269: 21627-21634
49. **Shi YE., Greene J., Wang M., Xiao G., Kiu YE.** (1996): *Loss of expression of TIMP-4, a novel human tissue inhibitor of metalloproteinase, in human breast cancer malignant progression.* In: Protease and protease inhibitors: AACR Special Conference: Marriott's Bay Point Resort, Panama City Beach A-10
50. **Stetler-Stevenson WG., Kruttsch HC., Liotta LA.** (1989): *Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2): a new member of the metalloproteinase inhibitor family.* J Biol Chem 264: 17374-17378
51. **Uhm JH., Dooley NP., Villemure J-G., Yong VW.** (1996): *Glioma invasion in vitro: regulation by matrix metalloproteinase-2 and protein kinase C.* Clin Exp Metast 14: 421-433
52. **Uria JA., Ferrando AA., Velasco G., Freije JMP., Lopez-Otin C.** (1994): *Structure and expression in breast tumours of human TIMP-3, a new member of metalloproteinase family.* Cancer Res 54: 2091-2094
53. **Wagner S., Stegen C., Bouterfa H., Huettner C., Kerkau S., Roggendorf W., Roosen K., Tonn JC.** (1998): *Expression of metalloproteinases in human glioma cell lines in the presence of IL-10.* Journal of Neuro-Oncology 40: 113-122
54. **Weber BH., Vogt G., Pruett RC., Stohr H., Felbor U.** (1994a): *Mutations in the tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) in patients with Sorsby's fundus dystrophy.* Nat Genet 8: 352-356

55. **Weber BH., Vogt G., Wolz W., Ives EJ., Ewing CC.** (1994): *Sorsby's fundus dystrophy is genetically linked to chromosome 22q13-qter*. Nat Genet 7: 158-161

56. **Zhao J., Zhou Q., Wiedmer T., Sims PJ.** (1998): *Level of expression of phospholipid scramblase regulates movement of phosphatidylserin to the cell surface*. J Biol Chem 273: 6603-6606

DANKSAGUNG

Ich danke Frau Prof. Dr. Remé und Herrn Prof. Dr. Jungwirth für die Überlassung des Themas und besonders Herrn Prof. Dr. Jungwirth für seine engagierte Unterstützung beim Durchführen der Versuche.

Der Ernst und Berta Grimmke-Stiftung, Düsseldorf danke ich für die finanzielle Unterstützung des Projektes.

Frau Prof. Dr. med. Rückle-Lanz danke ich für die freundliche Zusage als Korreferentin.

Außerdem möchte ich den Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. Jungwirth, Frau Dr. Barbara Zöller, Frau Ingrid Müller und Frau Kerstin Schieferdecker für die Einarbeitung in die Arbeitstechniken und ihre Hilfe bei Problemen während der Durchführung der Versuche danken.

Dank sagen möchte ich auch meiner Kollegin Frau Sandra Markert für die gute Zusammenarbeit und für die kritische Durchsicht des ersten Entwurfes dieser Arbeit. Für seine kompetente und geduldige Hilfe bei computertechnischen Problemen herzlichen Dank an Herrn Dr. C. U. Vogel.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name	Christina Meisenzahl
Geburtsdatum	30. Juni 1974
Geburtsort	Miltenberg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Konfession	römisch-katholisch
Familienstand	ledig

Schulbildung

1981 - 1985	Grundschule Miltenberg
1985 - 1994	Johannes-Butzbach-Gymnasium Miltenberg

Medizinstudium

11/1994 – 05/2001	Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg
08/1996	Ärztliche Vorprüfung
08/1997	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2000	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr

04 – 08/2000	Innere Medizin Universitätsklinik Würzburg
08 – 12/2000	Chirurgie - Kantonales Spital Grabs / CH Universität Bern
12/2000 – 04/2001	Dermatologie Universitätsklinik Würzburg
05/2001	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Würzburg, 28. Mai 2001

Christina Meisenzahl