

Diplomarbeit

**In vitro Expression von
ADAM-, ADAMTS- und ADAMTSL-Vertretern
in trophoblastären Carcinomlinien**

eingereicht von

Sebastian Dietl

Mat.Nr.: 0534249

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Institut für Pathophysiologie und Immunologie

unter der Anleitung von

Univ. Ass. Mag. Dr. Nassim Ghaffari-Tabrizi

Univ. Prof. Dr. Anton Sadjak

Graz, am

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am

Danksagungen

Ich möchte mich vor allem bei meiner Ehefrau Susanne und bei meiner Familie bedanken. Stets unterstützten sie mich mit Rat und Tat in allen Belangen und ermöglichten mir somit die Absolvierung meines Studiums und das Anfertigen dieser Arbeit.

Ganz besonders möchte ich auch meiner Betreuerin **Mag. Dr. Nassim Ghaffari-Tabrizi** für die Bereitstellung des Themas und ihre überaus engagierte und herzliche Betreuung danken.

An dieser Stelle sei auch Herrn Prof. Dr. Sadjak für die gute Infrastruktur und familiäre Atmosphäre des Institutes gedankt.

Zu guter Letzt noch vielen Dank an alle anderen, die mir bei meiner Arbeit geholfen haben. Insbesondere Mag. Dr. Robert Fuchs, Nathalie Allard, Carmen Tam-Amersdorfer und Mag. Dr. Adelheid Kresse.

Zusammenfassung

Einleitung: Maligne Tumoren gehören in den westlichen Industrienationen zur zweithäufigsten Todesursache im Erwachsenenalter und stehen daher im Mittelpunkt medizinischer Forschungsbemühungen. Interessanterweise gibt es zwischen malignen Tumorzellen und embryonalen Trophoblasten einige Parallelen, weshalb Studien mit Trophoblasten auch aus onkologischer Sicht interessant erscheinen. Zu diesem Zwecke wurden verschiedene Chorioncarcinomlinien als Trophoblastenmodelle etabliert. An diesen lässt sich auch die Rolle zahlreicher ins Tumorgeschehen involvierter Moleküle untersuchen. Erst seit wenigen Jahren sind hier die Vertreter der ADAM- (A Disintegrin And Metalloproteases) und ADAMTS- (A Disintegrin And Metalloproteases with Thrombo-Spondin motifs) Familien in das Blickfeld der Tumorforschung getreten. Durch die Regulation von Wachstumsfaktoren, die Interaktion mit Integrinen sowie die Degradierung extrazellulärer Matrix nehmen sie auf die Tumorentstehung und -progression Einfluss.

Material und Methoden: Zu Beginn dieser Arbeit wurden die vier Chorioncarcinomlinien Jar, Jeg3, Bewo und Ach3p angezüchtet. Nach dem Isolieren ihrer RNA, war die Hauptaufgabe, mittels RT-PCR und Gelelektrophorese nach dem Vorkommen von ADAM-, ADAMTS- und ADAMTSL-Vertretern in den vier Zelllinien zu screenen. Im Anschluss wurde das quantitative Vorkommen von ADAM 28 und ADAMTS 5 mittels Realtime PCR untersucht. Abschließend wurden Fluoreszenzfärbungen mit der Linie Ach3p und einem Antikörper gegen ADAMTS 5 durchgeführt.

Ergebnisse: Mittels RT-PCR konnten wir die Expression von ADAM 8, 9, 10, 12, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 28, 32 sowie von ADAMTS 1, 3, 5, 6, 7, 9, 13, 17, 20 und ADAMTSL 3, 4 und 5 in den vier Chorioncarcinomlinien nachweisen. In der anschließend für ADAM 28 und ADAMTS 5 durchgeführten Realtime PCR bestätigte sich das Expressionsmuster der RT-PCR. In unseren Immunfluoreszenzfärbungen mit der Linie Ach3p konnten wir schließlich auch den Nachweis von ADAMTS 5 auf Proteinebene führen.

Diskussion: Durch unsere Untersuchungen konnten wir ein Expressionsprofil der derzeit bekannten ADAMs, ADAMTSs und ADAMTSLs in den Chorioncarcinomlinien Jar, Jeg3, Bewo und Ach3p auf mRNA Ebene erstellen. Unsere Ergebnisse bilden die Grundlage für weitere funktionelle Versuche und tragen somit zum Verständnis dieser noch relativ neuen Proteinfamilien bei.

Abstract

Introduction: In the industrial nations cancer is one of the most common causes of death and therefore a central point of interest for medical science. Remarkably there are some analogies between cancer cells and trophoblasts. Because of these similarities studies on these placental cells are an interesting topic for the field of oncology. For studying trophoblasts there are some established choriocarcinoma cell lines. Working with them you can examine the role of certain molecules involved in the arising of tumors. Two relatively new groups of molecules involved in this process are the ADAM- (A Disintegrin And Metalloproteases) and ADAMTS- (A Disintegrin And Metalloproteases with Thrombospondin motifs) families. Through regulation of growth factors, interaction with integrins and degradation of the extracellular matrix these proteins are controlling the process of cancer arising.

Material and Methods: In the beginning the four choriocarcinoma cell lines Jar, Jeg3, Bewo and Ach3p were cultured and their RNA was isolated. After this we screened for the expression of ADAM-, ADAMTS- and ADAMTSL-members in these cell lines by means of RT-PCR. Then we examined in a Realtime PCR setting the quantitative amount of ADAM 28 and ADAMTS 5. In the end we made a immunofluorescence staining with an antibody against ADAMTS 5 in the cell line Ach3p.

Results: We could show the expression of ADAM 8, 9, 10, 12, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 28, 32 as well ADAMTS 1, 3, 5, 6, 7, 9, 13, 17, 20 as ADAMTSL 3, 4 and 5 in the four cell lines by RT-PCR. The following Realtime PCR with ADAM 28 and ADAMTS 5 confirmed the RT-PCR distribution results. Finally we could also demonstrate the expression of ADAMTS 5 in the cell line Ach3p on the protein level by immunofluorescence staining.

Discussion: We could create an expression profile of the currently known ADAMs, ADAMTSs and ADAMTSLs in the investigated choriocarcinoma cell lines Jar, Jeg3, Bewo and Ach3p. These findings build a basis for further functional investigations and contribute to the understanding of these relatively new protein families.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Vorwort.....	1
1.2	Tumormodell Plazenta.....	1
1.2.1	Plazentare Entwicklung.....	2
1.2.2	Parallelen und Unterschiede	5
1.3	Trophoblastenmodell Chorioncarcinom.....	9
1.4	ADAM, ADAMTS und ADAMTSL.....	14
1.4.1	Historie	14
1.4.2	Klassifikation.....	15
1.4.3	Funktioneller Aufbau.....	17
1.4.4	Funktionen.....	25
2	Zielsetzung	27
3	Material und Methoden	28
3.1	Zellkultur	28
3.1.1	Geräte, Gebrauchsmaterial, Chemikalien, Lösungen, Kulturmedien.....	28
3.1.2	Zelllinien Jar, Jeg3, Bewo und Ach3p.....	33
3.1.3	Auftauen, Kulturmedienwechsel, Splitten, Einfrieren, Mykoplasmentest, Anzucht zur Immunfluoreszenzfärbung	35
3.2	RNA-Isolierung	43
3.2.1	Geräte, Gebrauchsmaterial, Chemikalien, Lösungen	44
3.2.2	Isolierung, Konzentrationsbestimmung, Qualitätskontrolle.....	45
3.3	RT-PCR.....	49
3.3.1	Geräte, Gebrauchsmaterial, Chemikalien, Lösungen, Kits	49
3.3.2	RT-PCR, Gelelektrophorese, Fotodokumentation	50
3.4	Quantitative Realtime PCR	57
3.4.1	Geräte, Gebrauchsmaterial, Kits.....	57
3.4.2	Quantitative Realtime PCR, Auswertung.....	58
3.5	Immunfluoreszenz	65
3.5.1	Geräte, Gebrauchsmaterial, Chemikalien, Lösungen	65
3.5.2	Immunfluoreszenzfärbung, Fotodokumentation	66
4	Ergebnisse.....	76
4.1	RNA-Isolierung.....	76

4.2	RT-PCR.....	77
4.2.1	Nachgewiesene Vertreter.....	77
4.2.2	Nicht nachgewiesene Vertreter und unspezifische Banden.....	78
4.2.3	Gelfotos RT-PCR.....	79
4.3	Quantitative Realtime PCR.....	89
4.3.1	Referenzgen L 30.....	89
4.3.2	Effizienzbeurteilung.....	90
4.3.3	ADAM 28.....	92
4.3.4	ADAMTS 5.....	94
4.4	Immunfluoreszenz.....	97
5	Diskussion.....	104
6	Abkürzungen.....	114
7	Abbildungsverzeichnis.....	118
8	Tabellenverzeichnis.....	120
9	Bibliographie.....	121
10	Internetquellenverzeichnis.....	127
11	Lebenslauf.....	130

1 Einleitung

1.1 Vorwort

In aktuellen Todesstatistiken westlicher Industrienationen findet man heutzutage an vorderster Stelle Herz-Kreislaufkrankungen, Tumoren und Unfälle als führende Todesursachen. Vor allem die Tumorerkrankungen lösen aufgrund des verursachten Leidensweges und der oft noch schlechten Behandelbarkeit viele Ängste aus. Um die Entstehung von Tumoren zu verhindern und ihre Behandelbarkeit zu verbessern, fokussiert sich die Medizin in den letzten Jahrzehnten auf das Gebiet der Tumorpathologie wie auf kaum ein anderes. Während zu Beginn vor allem makro- und mikroskopische Aspekte in der Erforschung von Tumoren eine Rolle spielten, ist die Wissenschaft mittlerweile auf molekularer Ebene angekommen. Seit bekannt ist, dass die Ursache der Tumorentstehung in genomischen Mutationen mit konsekutiver abnormer Proteinproduktion begründet liegt, konzentriert sich ein großer Teil der Forschung auf die Effektorsubstanzen der Zelle, die Proteine. Nachdem die Rolle von Matrixmetalloproteasen bei der Tumorentstehung und -progression schon seit mehreren Jahren bekannt und untersucht ist, haben erst in letzter Zeit die Vertreter der ADAM- und ADAMTS-Familien für Aufsehen gesorgt. Diese scheinen bei einer Vielzahl physiologischer und pathologischer Prozesse wie etwa im Bereich der Zell zu Zell- und Zell zu Matrix-Interaktion, der Zellmigration oder der Aktivierung von Wachstumsfaktoren eine Rolle zu spielen, so auch im Bereich der Tumorbilogie (Mochizuki and Okada, 2007).

1.2 Tumormodell Plazenta

Laut Definition entsprechen maligne Tumoren abnormen Zellmassen körpereigener genetisch entarteter Zellen. Kennzeichnend ist neben ihrem autonomen Wachstum, eine gestörte Differenzierung sowie ein invasives Verhalten mit Tendenz zur Metastasierung. Maligne Zellen halten sich nicht mehr oder nur sehr bedingt an die Ordnung und Architektur des Gesamtorganismus und führen so zumeist zum Tode (Böcker, 2008). Trotz der Tatsache, dass die Plazenta für den Beginn des Lebens verantwortlich ist, während maligne Tumoren oftmals das Ende des Lebens herbeiführen, gibt es interessanterweise hinsichtlich Wachstum und invasivem Verhalten einige Parallelen (vgl. Abbildung 1.1). Ein Studium der sich entwickelnden Plazenta stellt sich nicht nur im Hinblick auf

physiologische Grundlagen als spannend heraus, sondern liefert auch einen modellhaften Einblick in die Biologie von Tumoren.

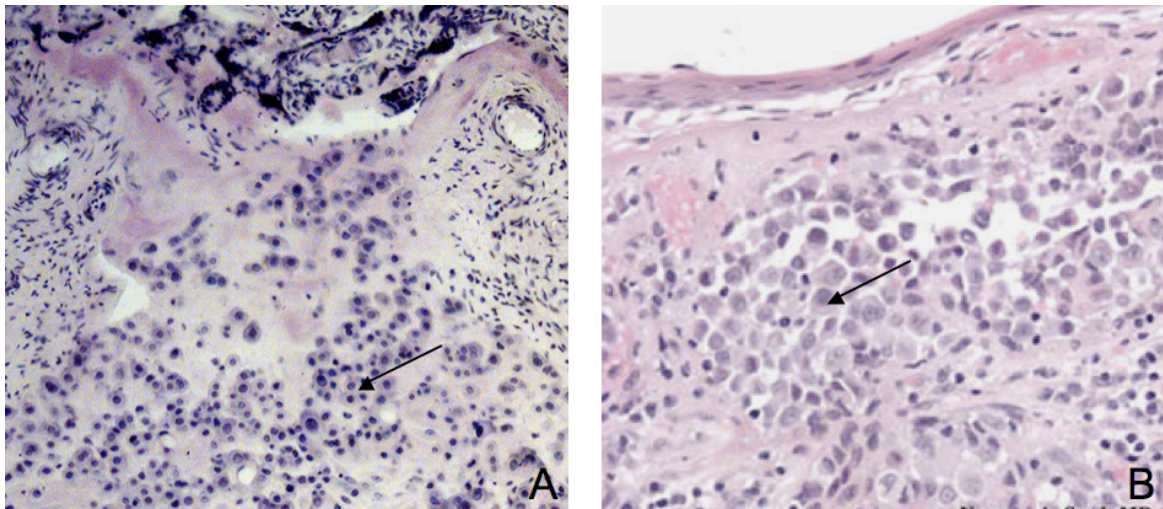


Abbildung 1.1 Trophoblasten- u. Melanominvasion

(A) Trophoblasten (←) invadieren in die Tiefe der Dezidua (Hartmann et al., 2008).

(B) Melanomzellen (←) bei ihrer Invasion in die Konjunktiva (1).

1.2.1 Plazentare Entwicklung

Nach Befruchtung der Eizelle erreicht der Embryo ca. am 4. Tag als Morula die Gebärmutterhöhle. Die bis dahin uniformen totipotenten Embryonalzellen beginnen sich nun zu differenzieren und einen äußeren sowie inneren Anteil zu bilden. Die inneren Zellen intensivieren unter Vermittlung von Cadherinen ihre Zellkontakte und sondern sich als innere Zellmasse von den äußeren Zellen ab. Mit diesen hängen sie nun nur noch an einem Pol (dem späteren Implantationspol) zusammen. Gleichzeitig füllt sich die entstehende Höhle mit Flüssigkeit. Das entstandene Gebilde wird nun Blastozyste (grie. blastos = Keim und kystis = Blase) genannt. Aus der inneren Zellmasse entwickelt sich später der Embryo. Sie wird daher als Embryoblast (grie. embryon = ungeborene Leibesfrucht) bezeichnet. Die äußere Zellschicht ist für die Einnistung des Embryos und die Bildung des embryonalen Anteils der Plazenta verantwortlich. Sie wird als Trophoblast (grie. trophe = Ernährung) bezeichnet. Am ca. 6. Tag während des sog. Implantationsfensters, wenn das Endometrium durch eine Vielzahl von Anpassungen optimal auf die Einnistung des Embryos vorbereitet ist, beginnt die Blastozyste nun mit der Implantation. Hierfür lagert sie sich mit ihrem embryonalen Pol unter Vermittlung der Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ an das Endometriumepithel an. Diese Anheftung ist für die Zellen

des Trophoblasten das Signal, am Anheftungspol zu proliferieren und sich weiter zu differenzieren. Die nach außen hin entstehenden Zellen (ebenfalls Trophoblasten genannt) beginnen miteinander zu verschmelzen und ein Synzytium zu bilden. Es entstehen nun zwei verschiedene Entitäten von Trophoblasten: die einzelligen Zytotrophoblasten (ZTs) und der vielkernige Synzytiotrophoblast (ST).

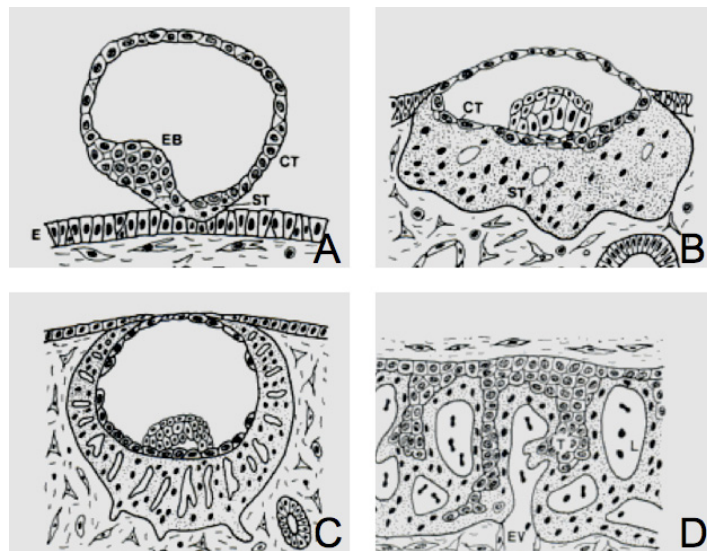


Abbildung 1.2 Implantation der Blastozyste (Benirschke and Kaufmann, 2000)

Letzterer schiebt nun fingerartige Fortsätze zwischen die Endometriumepithelzellen. Diese sind während dieser Zeit (sog. Implantationsfenster) auf die Einnistung des Embryos hormonell vorbereitet. Durch Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) vermittelt habe sie ihre E-Cadherine hinunterreguliert. Dies erleichtert dem ST das Durchdringen der Epithelbarriere (siehe Abbildung 1.2 A). Erreicht der ST nun die Basalmembran des Endometriumepithels beginnt sein Invadieren in das Stroma. Ausgestattet mit einer Vielzahl an Rezeptoren für die extrazelluläre Matrix „gräbt oder frisst“ sich der ST und mit ihm der Embryo in die Tiefe des Endometriums. Mit Hilfe von Matrixmetalloproteasen löst er dabei die extrazelluläre Matrix auf. Für seine Invasion ist der ST auf Nachschub an DNA, RNA und Proteinen angewiesen, da er selbst nicht proliferiert. Dies geschieht durch Verschmelzung mit sich stark teilenden ZTs. Ernährt wird der Embryo zu diesem Zeitpunkt durch den „Verdau“ von mit Glykogen und Lipiden prall gefüllten Deziduazellen (lat. decedere = abfallen) und Endometriumdrüsenzellen samt Sekret (uterine Milch). Durch die Produktion von Fas-Ligand und TNF- α durch den ST werden die mütterlichen Zellen der Apoptose unterworfen und fallen so dem ST anheim (siehe Abbildung 1.2 B). Bald erreicht der ST auch die mütterlichen Blutgefäße, die für das weitere Wachstum des Embryos essentiell

sind. Durch das Eröffnen der Gefäße strömt mütterliches Blut in Hohlräume, die sich im ST gebildet haben, sog. Lakunen (siehe Abbildung 1.2 C). Im Anschluss an dieses Stadium beginnen sich Zellsäulen von proliferierenden ZTs von zentral nach peripher durch den ST zu schieben (siehe Abbildung 1.2 D). Der Großteil dieser Zellen, die villösen Trophoblasten (lat. villus = Zotte), bildet später die verschiedenen Generationen der sog. Chorionzotten. Wiederum ein Großteil dieser Zellen stoppt, bevor er den ST fast durchwandert hat, und bildet Zotten, die nun in den sog. intervillösen Raum ragen. Dieser hat sich aus den zuvor entstandenen Blutlakunen gebildet hat und wird mit mütterlichem Blut gespült. Ein Teil der Zellsäulen schiebt sich jedoch ganz durch den ST und bildet sog. Haftzotten. Diese verankern den kindlichen Teil der Plazenta mit dem mütterlichen Gewebe im Bereich der sog. Basalplatte. Im Gegensatz zu den Zotten, die in den intervillösen Raum ragen, werden die Enden der Haftzotten nicht durch sich nachschiebendes Chorionmesenchym tunneliert, sondern es bleiben im Endbereich Zellsäulen aus ZTs bestehen (Moore et al., 2007; Murray and Lessey, 1999). Alle Trophoblasten, die nun nicht am villösen Stoffaustausch zwischen Mutter und Kind teilnehmen, werden als sog. extravillöse Trophoblasten (EVTs) bezeichnet. Dies umfasst nicht nur die Zellen der Zellsäulen, sondern auch der Basalplatte, der Chorionplatte, der Marginalzone, des Chorion laeve (grie. chorion = Zottenhaut, lat. levis = glatt), der sog. Zellinseln und der Septen. Von den Zellsäulen aus kommt es nun zu einer weiteren Invasion ins mütterliche Stroma, die diesmal jedoch nicht vom ST, sondern von EVT's ausgeführt wird (siehe Abbildung 1.3).

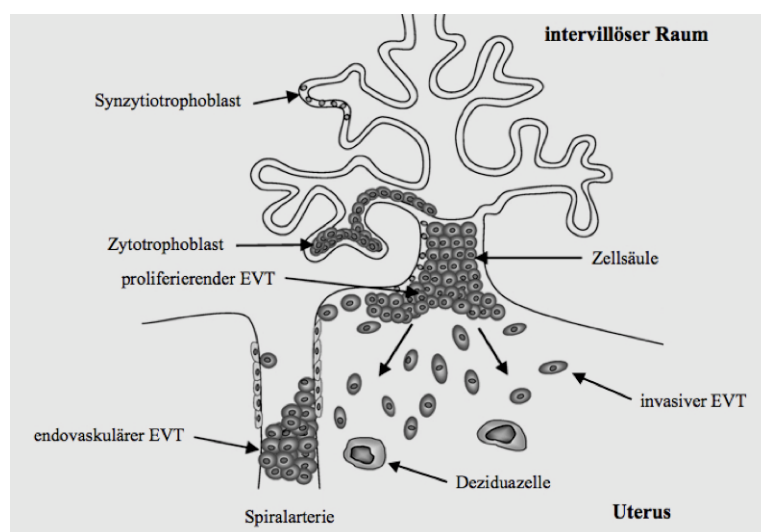


Abbildung 1.3 Trophoblasteninvasion (2)

Im Normalfall reicht sie bis ins innere Drittel des Myometriums. Nun breitet sich kein Zellsynzytium aus, sondern einzelne Zellen müssen sich aus dem Proliferationsverband lösen und amöboid durch das Gewebe migrieren. Ihre Aufgabe ist die Invasion in die uterinen Spiralarterien und deren Umbau, der die Versorgung des Embryos mit Blut garantieren soll.

1.2.2 Parallelen und Unterschiede

Um die Parallelen und Unterschiede zwischen Trophoblasten und Tumorzellen zu verstehen, ist ein Ausflug in die physiologische Invasion der kindlichen Trophoblasten in das Uterusgewebe und eine Gegenüberstellung der Verhaltensweisen beider Zelltypen nötig.

Penetration:

Nach der Adhäsion der Blastozyste an das mütterliche Endometrium beginnt der frisch entstandene ST fingerartige Fortsätze durch das mütterliche Epithel zu schieben und sich in die Tiefe des Endometriums zu „fressen“. Ein ähnlicher Vorgang findet sich möglicherweise beim Umbau der mütterlichen Spiralarterien durch die EVT's. Da jedoch bis heute nicht sicher geklärt ist, ob die Spiralarterien vom Stroma aus oder von endoluminal umgebaut werden, wird darauf nicht näher eingegangen (Benirschke and Kaufmann, 2000).

Proliferation:

Der Teil der ZT's, der epithelial im Bereich der fetalen Basalmembran sitzt, bildet in den ersten beiden Trimestern den proliferierenden „Stammzellpool“ für die invadierenden EVT's und wird als proliferierender Phänotyp bezeichnet. Zellen dieses Phänotyps exprimieren auf ihrer Oberfläche Connexin 40, E-Cadherine und $\alpha_6\beta_4$ Integrine, die an Laminin und Kollagen IV der Basalmembran binden. Wenn sie extrazelluläre Matrix produzieren, dann in einer polaren Weise wie es für die Basalmembranproduktion durch Epithelzellen typisch ist. Des Weiteren exprimieren sie den human epidermal growth factor receptor-1 (HER-1) und werden daher durch seine Liganden, den epidermal growth factor (EGF), den transforming growth factor- α (TGF- α) und Amphiregulin, zur Proliferation angeregt. Der placenta growth factor (PlGF) wirkt ebenfalls stimulierend auf die Zellteilung (Benirschke and Kaufmann, 2000).

Invasion:

Sobald sich die EVT's nun von der Basalmembran und dem Verband der proliferierenden Stammzellen gelöst haben, verändern sie sich. Es kommt zum switch zu einem invasiven Phänotyp. Die EVT's verlieren ihre Proliferativität und exprimieren nun Integrine wie $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$. Diese interagieren vor allem mit interstitiellen Matrixproteinen wie z.B. Fibronectin und Kollagen I, aber auch mit wachstumsregulierenden Proteinen wie dem insulin like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1). Auch wenn teilweise kontroverse Ergebnisse über Effekte von Rezeptorbindungen und Blockaden vorliegen, spielen sie und ihre Regulation im Invasionsgeschehen eine wichtige Rolle. Gesichert scheint die stimulierende Wirkung von insulin like growth factor-2 (IGF-2) auf die Migration. Auch die Sekretion von extrazellulärer Matrix, die nun als Matrixtyp-Fibrinoid bezeichnet wird, verändert sich. Sie erfolgt nun in einer apolaren Weise wie sie für interstitielle Zellen typisch ist. Dieses Matrixtyp-Fibrinoid schafft anscheinend vor allem bei seiner Degradierung durch die EVT's ein migrationsförderndes Milieu. An Rezeptoren exprimieren diese invasiven EVT's nun HER-2 und in frühen invasiven Stadien den colony stimulating factor-1 receptor (CSF-1-R). Auch scheint der vascular endothelial growth factor (VEGF), den mütterliche Makrophagen und Deziduazellen produzieren, auf invasive EVT's chemoattraktiv zu wirken, da sie entsprechende Rezeptoren besitzen. Die invasiven EVT's besitzen nicht nur proinvasive Rezeptoren, sondern exprimieren auch solche für TNF- α und TGF- β und unterwerfen sich damit trotz ihres tumorartigen Vordringens in den Uterus der Apoptose. Hierdurch bleibt eine Möglichkeit bestehen, die Invasion der Trophoblasten zu kontrollieren, wie sie für maligne Tumoren oftmals nicht mehr besteht. Ein zentraler Punkt für die Migration durch das mütterliche Gewebe ist nun der Verdau extrazellulärer Matrix. Um in die Tiefe vordringen zu können, müssen die invadierenden EVT's diese auflösen. Dies geschieht mittels Enzymen, von denen vor allem die Matrixmetalloproteasen (MMPs) aufgrund ihrer Wichtigkeit in diesem Prozess sehr gut untersucht sind. In einem streng und kompliziert geregelten und rückgekoppelten Zusammenspiel, an dem sowohl kindliche (EVT's) als auch die mütterliche Zellen (Deziduazellen, Makrophagen, uterine Natürliche Killerzellen) teilnehmen, werden MMPs und deren Aktivatoren wie z.B. Plasminogenaktivator als auch deren Inhibitoren wie z.B. die tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) und Plasminogenaktivatorinhibitoren ausgeschüttet. Zwei Signalüberträgerstoffe, die aufgrund ihrer Wichtigkeit nochmals erwähnt werden sollen, sind TNF- α und TGF- β . TNF- α wird zum einen sowohl in EVT's als auch in mütterlichen Makrophagen und uterinen Natürlichen Killerzellen (uNKs)

exprimiert. Zum anderen kommt sein Rezeptor sowohl auf EVT's als auch auf Makrophagen, uNKs und Deziduaellen vor. Somit besteht auch hier eine gegenseitige Beeinflussung während der Invasion. TGF- β soll nochmals erwähnt werden, da er einen entscheidend bremsenden Einfluss auf die EVT-Invasion hat. Der hier aufgezeigte switch von proliferativen zu invasiven EVT's scheint die Vorgänge Proliferation und Invasion zu trennen. Auf den ersten Blick unterscheiden sich hier die EVT's trotz ihrer starken Proliferation und Invasion doch deutlich von Tumorzellen. Aus Studien an extrauterinen Schwangerschaften und zu tiefen Invasionen der Trophoblasten (z.B. Plazenta percreta) weiß man jedoch, dass dies zu oberflächlich betrachtet ist. Vielmehr hängt diese Trennung von lokalen Faktoren und der Interaktion von mütterlichen Zellen der Dezidua mit den Trophoblasten ab. Funktioniert dieses Zusammenspiel nicht, läuft die Implantation ungeordnet ab und kann zu erheblichen Komplikationen führen (Benirschke and Kaufmann, 2000; Murray and Lessey, 1999).

Gefäßinvasion und Neoangiogenese:

Auch im Verhalten gegenüber Blutgefäßen ähneln Trophoblasten Malignomzellen. Nachdem der ST zu Beginn der Invasion Gefäße eröffnet hat und sich dadurch Blutlakunen und der intervillöse Raum bilden konnten, kommt es zu einem weiteren Ausbau der Blutversorgung durch die EVT's. Denn die ausreichende Versorgung mit Blut ist für ein so schnelles Wachstum, wie es der Embryo oder Tumoren zeigen, essentiell. Zum einen fördern die EVT's durch die Produktion des basic fibroblast growth factors (bFGF) und placenta growth factors (PlGF) die Neoangiogenese. Zum anderen infiltrieren sie die Wände der mütterlichen Spiralarterien und bauen diese um. Es kommt zur Dilatation der Arterien, zum Abbau elastischer Fasern und glatter Muskulatur und zur Einlagerung von Fibrinoid und sog. endovaskulärer EVT's (eEVT's), die teilweise Endothelzellen ähneln und diese auch zum Teil ersetzen. Letztendlich entstehen starre weite Rohre, die bis zu einem gewissen Grad von der Vasomotorik der Mutter entkoppelt sind und die Versorgung des Embryos garantieren. Die Migration der EVT's in Richtung Gefäße ist ein Vorgang, der vom Sauerstoffpartialdruck im Gewebe abhängt. Niedrige Drücke stimulieren hier die Invasivität. Bei der Ausbreitung in den Gefäßen spielen nun spezifische endotheliale Adhäsionsmoleküle, die nun von den eEVT's exprimiert werden, wie z.B. VE-Cadherin, eine Rolle. Interessanterweise ähnelt dieser Prozess entzündlichen Vorgängen, da die Endothelzellen E- und P-Selektin exprimieren, die mit sialyl Lewis x auf den eEVT's interagieren. Trotz der Gefäßinvasion, die stark an maligne Tumoren erinnert, bleibt dieses

Vordringen doch auch hier ein regulierter Prozess, an dem auch wieder mütterliche Zellen (TNF- α produzierende Makrophagen) beteiligt zu sein scheinen (Benirschke and Kaufmann, 2000; Murray and Lessey, 1999).

Unterlaufen der Immunabwehr:

Das letzte Phänomen, das hier besprochen werden soll, weil es auch hier Parallelen zwischen Trophoblasten- und Tumorzellen gibt, ist die Modulation der mütterlichen Immunabwehr. Sowohl Trophoblasten als auch Tumorzellen teilen das Problem, dass sie normalerweise vom Immunsystem als fremd erkannt und bekämpft werden. Der Trophoblast und das mütterliche Gewebe entgehen dieser Problematik auf mehrere Arten. Zum einen exprimieren die Trophoblasten auf ihrer Oberfläche nur wenige bis keine klassische human leukocyte antigens (HLA-A, -B, -C), um nicht von zytotoxischen T-Zellen erkannt zu werden. Damit sie nun bedingt durch die wenigen bis fehlenden klassischen HLA-Moleküle nicht von uNK-Zellen lysiert werden, präsentieren sie an ihrer Oberfläche HLA-C, -E, -G. Diese sind zu schwach, um zytotoxische T-Zellen zu aktivieren, sie reichen jedoch aus, um die uNK-Zellen nicht zu aktivieren. Außerdem produzieren die Trophoblasten immunsuppressive Stoffe wie TNF- α , den early pregnancy factor (EPF) oder das Enzym Indolamin-Dioxygenase (IDO), welches das für die Lymphozytenproliferation so wichtige Tryptophan abbaut. Doch auch die Mutter stellt sich während dieser Zeit auf das Tolerieren des genetisch halbfremden Embryos ein. Die T-Zellen scheinen weniger und schwächere T-Zell-Rezeptoren zu besitzen. Zusätzlich produzieren Makrophagen und Deziduazellen Prostaglandin E₂, welches unter anderem über erniedrigte Interleukin-2 Spiegel in der Plazenta immunsuppressiv wirkt. Außerdem scheinen uNK-Zellen sowohl über die Produktion von TNF- α und TGF- β , als auch über die Produktion anderer Interleukine eine ganz zentrale Rolle zu spielen. Ein weiterer interessanter Aspekt ist das vom T-Helferzelltyp 2 (TH-2) getragene Interleukinmilieu der Plazenta, das mit Interleukinen wie IL 10 eher immunsuppressiv wirkt. Ähnliche Beobachtungen lassen sich auch bei Tumoren machen. Einige produzieren ebenfalls Prostaglandin E₂ und auch das Interleukinprofil ist in manchen Fällen eher TH-2 getragen. Wichtig erscheint auch, dass manche Tumoren keine HLA-Moleküle exprimieren (Benirschke and Kaufmann, 2000; Mullen, 1998).

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass sich einige Ähnlichkeiten zwischen Tumorzellen und Trophoblasten ergeben. Beide Zellarten zeigen eine starke Proliferation,

die durch die Expression von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren zustande kommt. Neben dem Durchbrechen von epithelialen Barrieren sind beide in der Lage unter Einsatz von spezifischen Adhäsionsmolekülen und Proteasen in das Gewebe zu invadieren und zu migrieren. Auch hinsichtlich der Neoangiogenese und Gefäßinvasion sowie hinsichtlich der Unterwanderung der Immunabwehr zeigen sich Parallelen. (Murray and Lessey, 1999). Im Unterschied zu malignen Tumoren finden jedoch all diese beschriebenen Prozesse und Mechanismen im Falle einer physiologischen Implantation in einer kontrollierten Art und Weise statt. In intensiver Interaktion mit dem mütterlichen Gewebe und auch unter eigener Maßregelung proliferieren und invadieren die Trophoblasten. Zu keiner Zeit entziehen sie sich der Apoptose. So verläuft die Implantation nun örtlich und zeitlich limitiert und ist im Unterschied zu malignen Tumoren weder autonom noch destruktiv. Folglich lassen die beschriebenen Ähnlichkeiten nicht den Schluss zu, dass Trophoblasten Zellen mit malignen Eigenschaften seien. Die aufgezeigten Mechanismen sind während der Embryonalentwicklung für das Entstehen von neuem Leben essentiell und eigentlich benigne. Erst ihre unkontrollierte Reaktivierung, wie sie bei malignen Tumoren stattfindet, hat solche schwerwiegenden Folgen. Tumorzellen erfinden also oftmals das Rad nicht neu, sondern reaktivieren in vielen Fällen Mechanismen, die genetisch verankert sind und in embryonalen Stadien bereits aktiv genutzt wurden. So scheint also die Plazenta auch als Modell zur Erforschung der Biologie von Tumoren sehr interessante Ansätze zu bieten (Benirschke and Kaufmann, 2000; Murray and Lessey, 1999).

1.3 Trophoblastenmodell Chorioncarcinom

Da aus Plazentagewebe isolierte Trophoblasten schon nach kurzer Zeit ihre Proliferativität verlieren und in Apoptose gehen, ist der in vitro Umgang mit ihnen kompliziert. Außerdem ist die Verfügbarkeit von frühem Plazentagewebe, das noch sehr invasive Trophoblasten enthält, nur sehr begrenzt und die Isolation von Trophoblasten zeitaufwändig (Hiden et al., 2007). Eine Zellentität, die diese für die in vitro Forschung negativen Eigenschaften nicht besitzt und dennoch Trophoblasten in Herkunft und Verhalten sehr nahe steht, ist das Chorioncarcinom. Dieser zwar seltene aber sehr maligne epitheliale Tumor leitet sich in den meisten Fällen im Zuge einer Schwangerschaft von Trophoblasten ab. Etwa die Hälfte der schwangerschaftsassozierten Chorioncarcinome entsteht auf dem Boden einer kompletten Blasenmole. Bei dieser Erkrankung kommt es zur Befruchtung einer „leeren“ Eizelle, die keinen mütterlichen Zellkern mehr besitzt. Alle sich aus dieser befruchteten

Eizelle entwickelnden Zellen enthalten folglich nur väterliche Gene. Befruchtet nur ein Spermium die Eizelle entstehen Zellen mit einem 46, XX Karyotyp (90 %). Bei der gleichzeitigen Befruchtung durch zwei Spermien können 46, XX oder 46, XY Karyotypen (10 %) entstehen. Die andere Hälfte der schwangerschaftsassozierten Chorioncarcinome entwickelt sich im Anschluss an einen Abort (25 %), eine „normale“ Schwangerschaft (22,5 %) oder eine Extrauterin gravidität (2,5 %). Makroskopisch zeigt sich das Chorioncarcinom als solider und oft hämorrhagischer Tumor, der mikroskopisch oft zentral zytotrophoblastische und peripher synzytiale Malignomzellen und eine starke Vaskularisierung erkennen lässt. Im Gegensatz zu seiner Differentialdiagnose dem Chorionadenoma destruens zeigt das Chorioncarcinom histologisch keine Zotten. Bedingt durch eine Dilatation des endoplasmatischen Retikulums zeigen die Zellen oft ein auffällig vakuoliertes Zytoplasma.

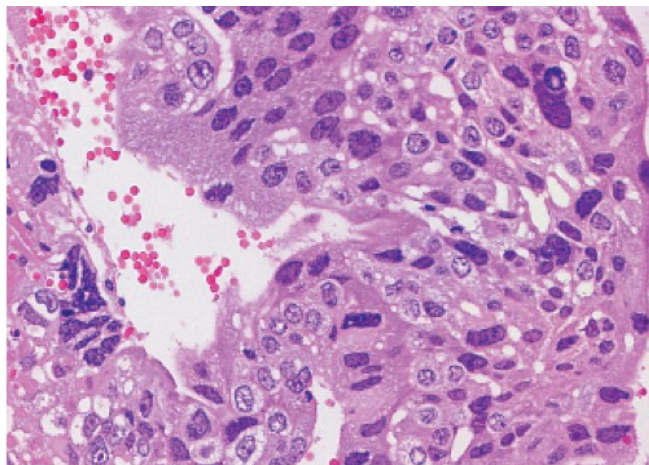


Abbildung 1.4 Chorioncarcinom (Böcker, 2008)

Aufgrund einer starken Gefäßinvasivität streut der Tumor rasch. Hauptmanifestationsorte einer Metastasierung sind vor allem die Lungen. Auch im Gehirn, der Leber und den weiblichen Geschlechtsorganen finden sich häufig Metastasen. Wie der Synzytiotrophoblast produziert auch das Chorioncarcinom humanes Choriongonadotropin (hCG), was für die Diagnose und auch die Therapieüberwachung von zentraler klinischer Bedeutung ist. Die Therapie richtet sich nach der klinischen Einteilung in low und high risk Entitäten. Die Einteilung hängt wiederum von der Metastasierung, der Latenz zwischen Schwangerschaft und Symptomen, der hCG Konzentration und der Rezidivrate ab. Trotz der hohen Malignität lässt sich das Chorioncarcinom relativ gut behandeln, so dass im Falle eines low risk Tumors mit einer 100 % und im Falle eines high risk Tumors

mit einer 75 % Remission gerechnet werden kann. Zum Einsatz kommt in der Therapie vor allem das Chemotherapeutikum Methotrexat, das im high risk Fall aufdosiert und chemotherapeutisch ergänzt wird. Am Rande sei nur die besondere immunologische Situation im Falle eines schwangerschaftsassozierten Chorioncarcinoms, das sich auf dem Boden einer kompletten Blasenmole entwickelt hat, erwähnt. Hier spielt bei der relativ guten Therapierbarkeit wahrscheinlich die Tatsache, dass es sich für das mütterliche Immunsystem um Gewebe handelt, das als fremd erkenn- und angreifbar ist, eine Rolle (Benirschke and Kaufmann, 2000; Böcker, 2008). In den letzten Jahrzehnten wurden eine Reihe von Chorioncarcinomzelllinien als brauchbare in vitro Modelle etabliert (Wolfe, 2006). Vorreiter war Roy Hertz, der 1959 die drei Stämme Wo, Bo und Ma generierte, die er zum Dank nach Erwin und Turner als Erwin-Turner Chorioncarcinome bezeichnete. Ausgangsmaterial waren histologisch gesicherte Chorioncarcinome dreier betroffener Frauen. Das Tumorausgangsgewebe der Stämme Wo und Ma wurde während der Autopsie aus Gehirnmetastasen gewonnen. Der Stamm Bo wurde aus Tumorgewebe einer resezierten Brustmetastase gezogen. Durch serielle Inokulation der Chorioncarcinome in die Backentaschen von immunsupprimierten Goldhamstern konnten drei humane Chorioncarcinomlinien generiert werden. Der Wo-Stamm passte sich so gut an, dass nach einiger Zeit keine Immunsuppression der Trägartiere mehr nötig war. Trotz mehrfacher heterologer Passage blieben die Stämme ihrem Tumorausgangsgewebe histologisch sehr ähnlich. Auch produzierten alle drei Linien das für Chorioncarcinome typische hCG. Wurden die Zellen nicht weitertransferiert, so blieb, durch die einsetzende Tumornekrose, nach 30 Tagen nur noch Narbengewebe zurück. Interessanterweise kam es trotz der malignen Natur dieser Zellen in keinem Fall zur Invasion in die Wand der Hamsterbackentaschen, auch konnten keine Metastasen festgestellt werden (Hertz, 1959). Da jedoch bei einer Inokulation an anderer Stelle sehr wohl Filien auftreten, scheint es sich bei den Backentaschen von Hamstern um einen immunologisch privilegierten Ort zu handeln (Benirschke and Kaufmann, 2000). 1968 gelang es dann Roland Patillo und George Gey erstmals, eine humane Chorioncarcinomlinie Namens Bewo zu etablieren, die rein in vitro gezüchtet werden konnte, ohne auf eine Tierpassage angewiesen zu sein. Gleichzeitig war die Zelllinie Bewo die erste hormonproduzierende humane Zelllinie, die in permanenter Zellkultur gehalten werden konnte. Das von Patillo und Gey verwendete Ausgangsgewebe waren Zellen des Wo(ods)-Stammes des Erwin-Turner Chorioncarcinoms, die sie während der 304. Tierpassage von Hertz erhielten. Die parabiologische Kokultur mit glykogenreichem Deziduagewebe stellte sich bei der

Etablierung als am zielführendsten dar. Versuche, Chorioncarcinomzellen „unangepasst“ ohne vorherige Tierpassage, als in vitro Modell zu generieren, scheiterten auch bei Patillo und Gey zu dieser Zeit (Patillo and Gey, 1968). Erst 1971 gelang es Patillo, aus einer Plazentabiopsie Zellen eines Chorioncarcinoms, das sich in Folge einer Schwangerschaft mit einem männlichen kaukasischen Feten entwickelt hatte, zu gewinnen und diese als Jar benannte Linie direkt in Kultur zu bringen (Patillo et al., 1971). Im gleichen Jahr gelang es Peter Kohler und William Bridson die 6 klonalen Chorioncarcinomlinien Jeg1, -2, -3, -4, -7 und -8 als permanente in vitro Modelle zu etablieren. Ausgangsgewebe waren Zellen des Wo(ods)-Stammes von Hertz während ihrer 387. Passage. Kohler und Bridson isolierten einzelne der in vitro auswachsenden Chorioncarcinomzellen und vermehrten diese klonal. Interessanterweise stellte sich im Vergleich zu den Versuchen Patillos mit den Zellen des Woods-Stammes die Anzucht diesmal in der 387. Passage als leichter heraus, was wahrscheinlich in einer weiteren Adaptation der Zellen begründet lag. Als ebenfalls auffällig erschien, dass die Zellen nach ihrer Klonierung keine stark vaskularisierten soliden Tumoren mehr bildeten, wenn sie erneut in die Backentaschen von Hamstern inokuliert wurden, sondern zystische Strukturen ohne Invasion in Gefäße (Kohler and Bridson, 1971). Die von Hertz, Patillo und Kohler entwickelten Linien eignen sich nun sehr gut für die Erforschung des Chorioncarcinoms inklusive eventueller Therapiestrategien. Auch für die modellhafte Untersuchung des Invasionsverhaltens von Trophoblasten sind sie geeignet. Jedoch darf man nicht vergessen, dass es nicht nur Übereinstimmungen zwischen Chorioncarcinomzellen und Trophoblasten gibt, sondern auch teilweise erhebliche Unterschiede (Autonomie, genomische Labilität...). Um diese Differenzen etwas zu schmälern und um noch näher an die Physiologie der Trophoblasten heranzukommen, kehrte man wieder etwas zu den Wurzeln des Chorioncarcinoms zurück, indem man Chorioncarcinomzellen mit ihrem physiologischen Ursprungszelltyp den Trophoblasten fusionierte und somit sozusagen immortalisierte Trophoblastenhybride erhielt (Hiden et al., 2007). Grundproblem bei diesem Lösungsansatz ist die Tendenz der nicht fusionierten stark proliferativen Tumorzellen, die langsamer wachsenden Hybride zu überwuchern. Durch Einsatz von Tumorzellen, die das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phospho-Ribosyl-Transferase (HGPRT) nicht bilden können, sog. HGPRT (-) Mutanten, ließ sich jedoch auch dieses Problem lösen (Funayama et al., 1997). Das auf dem X-Chromosom lokalisierte HGPRT-Gen ist für die Wiederverwertung der Purine Hypoxanthin und Guanin verantwortlich. Ein Großteil der für die Herstellung der Nukleotide nötigen Purinbasen wird nicht neu synthetisiert, sondern aus Effizienzgründen

recycelt (sog. salvage pathway). Das Enzym HGPRT verstoffwechselt Guanin zu Guaninmonophosphat und Hypoxanthin zu Inosinmonophosphat, welches wiederum in Guanin- oder Adenosinmonophosphat umgewandelt werden kann (Löffler, 2008). Wird nun selektiv die Purinneusynthese gehemmt, überleben nur Hybride, da sie durch die Fusion mit Trophoblasten den salvage pathway beschreiten und weiterhin Nukleotide produzieren können. Dies geschieht durch den Einsatz eines Selektionsmediums, das einen Purinsynthesehemmer wie Azaserin und als recycelbares Substrat Hypoxanthin enthält. Funayama und Mitarbeitern war es gelungen durch Mutation und Selektion aus der Chorioncarcinomlinie Jeg3 die HGPRT (-) Mutante Ac1 zu ziehen und durch weiteres Klonen und Selektionieren schließlich die Linie Ac1-1 als Fusionspartner zu etablieren (Funayama et al., 1997). Die von Ursula Hiden und Mitarbeitern durch Fusion der Linie Ac1-1 und Ersttrimestertrophoblasten erzeugte Hybridlinie Ach3p stellt nun einen solchen Trophoblastenhybrid dar. Die entstandenen Zellen ähneln hinsichtlich ihrer Morphe, Proliferativität und ihres Chromosomensatzes der Linie Ac1-1, zeigen aber funktionell eine größere Nähe zu Ersttrimestertrophoblasten. Wie für Trophoblasten typisch sind sie ebenfalls Zytokeratin positiv. Auch zeigen sie Subpopulationen invasiver HLA-G positiver Zellen, ähnlich den invasiven EVT's und Subpopulationen proliferierender HLA-G negativer Zellen, ähnlich den villösen ZTs. Ihr Expressionsmuster und ihr Invasionsverhalten ähneln ebenfalls eher dem früher Trophoblasten als der Linie Ac1-1 (Hiden et al., 2007). Kurzum ergänzt die Linie Ach3p, sozusagen als Zwischenglied, die anderen 3 Linien, so dass im Moment vier in vitro Modelle bestehen, die sowohl für die Beschreibung physiologischer (Implantation) als auch pathologischer (Tumorinvasion) Biovorgänge geeignet erscheinen.

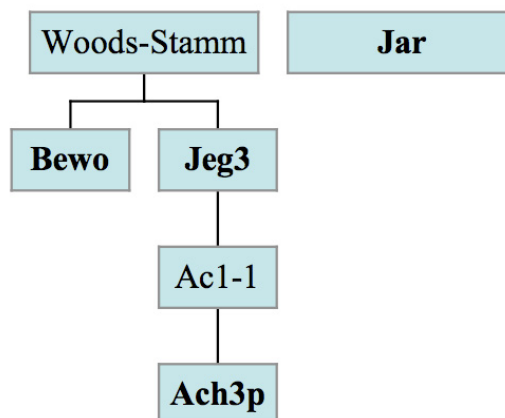


Abbildung 1.5 Chorioncarcinomlinien

1.4 ADAM, ADAMTS und ADAMTSL

Wie im Vorwort kurz erwähnt sind die Vertreter der ADAM-, ADAMTS- und ADAMTSL-Familien erst seit relativ kurzer Zeit bekannt. Die Abkürzungen stehen für A Disintegrin And Metalloprotease, A Disintegrin And Metalloprotease with Thrombo-Spondin motifs und A Disintegrin And Metalloprotease with Thrombo-Spondin motifs-Like.

1.4.1 Historie

1987 entdeckte Primakoff bei Untersuchungen zur Fusion von Spermium und Eizelle am Meerschweinchen ein Protein, dessen Blockade mit Antikörpern die Fusion drastisch reduzierte. Ohne zu wissen, eine neue Familie von Proteinen entdeckt zu haben, nannte er es PH-30 (Primakoff et al., 1987). Erst genauere Untersuchungen durch Blobel und Wolfsberg ergaben, dass PH-30 aus zwei ähnlichen Untereinheiten aufgebaut war und sich diese stark ähnelten. Bei der genaueren Analyse und dem Vergleich mit den damals schon bekannten Schlangengiftmetalloproteasen und dem Fusionsprotein des Rötelvirus stellte sich heraus, dass die PH-30 Untereinheiten ähnlich wie die Schlangengiftproteasen aus mehreren verschiedenen Domänen aufgebaut waren und sowohl eine Metalloproteasen- als auch eine Disintegrin-Domäne besaßen. Außerdem schienen sie wie das Fusionsprotein des Rötelvirus eine Funktion bei der Zelladhäsion und -fusion zu haben (Blobel et al., 1992; Wolfsberg et al., 1993). In Anlehnung an ihren Aufbau, ihre Verwandtschaft zu den Schlangengiften und an ihre Rolle bei der Fertilisation wurden sie von Wolfsberg und Mitarbeitern als ADAMs bezeichnet (Wolfsberg et al., 1995b). Mit den PH-30 Untereinheiten PH-30 α und PH-30 β waren die ersten beiden ADAMs, nämlich ADAM 1 und 2 entdeckt und benannt (Wolfsberg et al., 1995a, 1995b). Seitdem ist diese Familie ständig am wachsen und beinhaltet momentan quer durch die Bank verschiedener Organismen ca. 40 Vertreter (3). Beim Menschen konnten derzeit 25 ADAM Gene nachgewiesen werden, von denen allerdings fünf Pseudogene (ADAM 1, 3, 5, 6, 24) sind, das heißt, dass diese nicht translatiert werden (<http://www.genenames.org>). Teilweise werden die ADAMs auch als MDCs (Metalloprotease/Disintegrin/Cysteinreich) bezeichnet oder mit ihren Trivialnamen genannt (Hooper, 2010). In dieser Arbeit findet jedoch nur die systematische Nomenklatur der ADAM's Anwendung. Die Vertreter der ADAMTS-Familie wurden erst einige Zeit später entdeckt. Bei der Suche nach Tumorkachexie auslösenden Faktoren in der murinen Colonadenocarcinomlinie 26 entdeckte Kuno ein Gen, das vom Aufbau den ADAM Genen sehr ähnelte und zu Beginn als C151 bezeichnet

wurde. Auffällig war, dass es im Unterschied zu den ADAMs jedoch keine Transmembran-Domäne, sondern Thrombospondinmotive zeigte. Kuno nannte dieses Protein daher A Disintegrin And Metalloprotease with Thrombo-Spondin motifs 1 (ADAMTS 1) und zeigte ferner, dass es sowohl im Bereich der Tumorkachexie als auch bei inflammatorischen Prozessen eine Rolle zu spielen scheint (Kuno et al., 1997). Seither sind 19 verschiedene Vertreter bekannt (<http://www.genenames.org>), die allesamt auch beim Menschen vorkommen (Porter et al., 2005). 2002 publizierte schließlich Hirohata die Entdeckung eines Proteins, das große Sequenzhomologien zur C-terminalen Hälfte von ADAMTS 1 hat und nannte es daher ADAMTS-like 1 (ADAMTSL 1) (Hirohata et al., 2002). Die damit neu entdeckte Familie umfasst mittlerweile laut Entrez Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) 6 beim Menschen exprimierte Vertreter und wird in nächster Zeit wahrscheinlich ebenfalls weiter wachsen.

1.4.2 Klassifikation

Die Einordnung der ADAM's, ADAMTS's und ADAMTSL's in die Taxonomie der Proteine ist aufgrund ihres Aufbaus aus verschiedenen funktionellen Domänen nicht einfach und oft nicht ganz korrekt. Auch die in dieser Arbeit verwendete Bezeichnung Familie ist zumeist nicht als klassifizierend anzusehen, sondern wird der sprachlichen Einfachheit halber verwendet, um die verschiedenen Vertreter zusammenzufassen. In der Regel erfolgt die Einteilung der Vertreter anhand von Homologievergleichen mit Sequenzen bereits bekannter Proteine und anhand ihrer meist vorhandenen Metalloproteasen-Domäne. Wie erwähnt, zählen die Vertreter der ADAM-, ADAMTS- und ADAMTSL-Familien zu den Proteinen, die ersten beiden genauer gesagt zu den Enzymen. Sie sind in der Lage, unter Einlagerung von Wasser Peptidbindungen zu spalten und werden deshalb zu den Proteasen (= Proteinasen oder Peptidasen) gerechnet. Da sie in ihrem aktiven Zentrum ein katalytisch aktives Metallion tragen, werden sie Metalloproteasen genannt. In ihrem Falle ist dies ein Zinkion, weshalb man sie zur Superfamilie der Zinkproteasen zählt. Da an der Bildung des aktiven Zentrums unter anderem ein konserviertes (sprich regelhaft vorkommendes) Methionin teilnimmt, zählt man sie weiters zu den Metzinkinen. Vielen Vertretern der Metzinkine ist eine hochkonservierte Aminosäuresequenz (**HExxHxxGxxH**; H = Histidin, E = Glutaminsäure, G = Glycin, x = variabel) im Bereich des aktiven Zentrums gemein. Hier koordinieren drei Histidinreste und der schon erwähnte weiter C-terminal gelegene

Methioninrest das für die katalytische Funktion essentielle Zinkion im aktiven Zentrum. Die Metzinkine lassen sich noch weiter unterteilen, so dass die Vertreter der ADAM- und ADAMTS-Familien letztendlich zu den Adamalysinen gezählt werden, die auch die Familie der Schlangengiftmetalloproteasen (snake venom metalloproteases = SVMPs) beherbergen. Adamalysin ist Bestandteil des Giftes der Diamantklapperschlange (*Crotalus adamanteus*) und als Prototyp namensgebend (Seals and Courtneidge, 2003). Der Richtigkeit halber soll noch erwähnt sein, dass im Gegensatz zu den ADAMTSs und SVMPs nur ca. 60 % der humanen ADAM's die konservierte Sequenz (**HExxHxxGxxH**) besitzen und damit katalytisch aktiv sind. Die restlichen 40 % werden dennoch zu den Adamalysinen gezählt (Hooper, 2010). Lediglich hinter dem Hintergrund der Sequenzhomologie ist die Tatsache korrekt, dass die erst kürzlich entdeckten ADAMTSLs, die keinerlei Metalloproteasen-Domäne besitzen, mit den ADAMTSs zu einer Superfamilie zusammengefasst werden. Eine funktionelle Zuordnung zu den Metalloproteasen wäre falsch. Eine weitere Möglichkeit, die ADAM- und ADAMTS-Vertreter einzuteilen, findet sich in der Internetdatenbank MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>). Hier sind alle bisher bekannten Peptidasen und ihre Inhibitoren hierarchisch nach ihrer Struktur klassifiziert. Peptidasen mit ähnlichen Aminosäuresequenzen sind hier zu Familien geordnet, die wiederum bei Homologien zwischen den Familien zu einem Clan zusammengefasst werden. Auch hier werden die katalytisch inaktiven ADAM-Vertreter mitgeführt, die ADAMTSLs jedoch nicht.

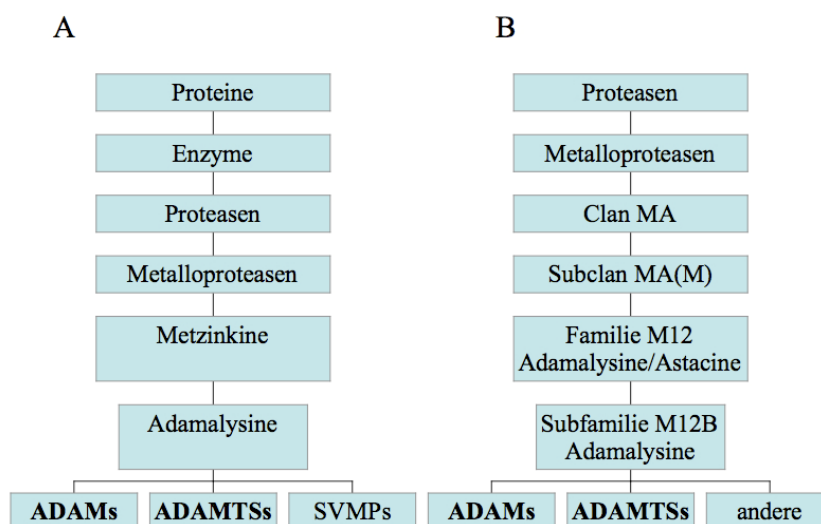


Abbildung 1.6 Klassifikation ADAMs und ADAMTSs

(A) Einteilung anhand der Metalloproteasen-Domäne

(B) Einteilung nach MEROPS

Es gibt im Übrigen noch weitere ADAM-ähnliche Proteine (z.B. ADAMDEC 1), die im Moment noch ein Dasein am Rande der gängigen Klassifikationen führen.

1.4.3 Funktioneller Aufbau

Der Aufbau aus multiplen Domänen, der sich auch in einer Vielzahl von biologischen Funktionen widerspiegelt, macht die Vertreter dieser Familien zu besonderen Proteinen. Bei der Fülle an einzelnen Vertretern, ist der nachfolgend beschriebene Aufbau jeweils nur als Prototyp einer Familie zu verstehen und kann von Vertreter zu Vertreter variieren. Die unmodifizierten neusynthetisierten ADAMs (= Prä-Pro-Form) setzen sich aus einer Signalsequenz, einer Pro-, einer Metalloproteasen-, einer Disintegrin-, einer cysteinreichen, einer EGF-ähnlichen, einer transmembranären und einer zytoplasmatischen Domäne zusammen. Wie an den letzten beiden Domänen ersichtlich, handelt es sich bei den ADAMs normalerweise um membrangebundene Proteine. Allerdings können bei der posttranskriptionellen Prozessierung teilweise auch kürzere Spleißvarianten produziert werden, die sezerniert werden. Diese werden dann mit S gekennzeichnet. Während die Sekretion der ADAM's eher die Ausnahme ist, ist sie bei den ADAMTSs die Regel. Diese bestehen wie die ADAMs aus einer Signalsequenz, einer Pro-, einer Metalloproteasen- und einer Disintegrin(ähnlichen)-Domäne. Hierauf geht jedoch ein Thrombospondinmotiv einer cysteinreichen Domäne voraus. Dieser wiederum folgt dann eine sog. Spacerregion, bevor sich wieder in variabler Zahl (0-14) Thrombospondinmotive anschließen. Die EGF-ähnliche, sowie die transmembranäre und zytoplasmatische Domäne fehlen.

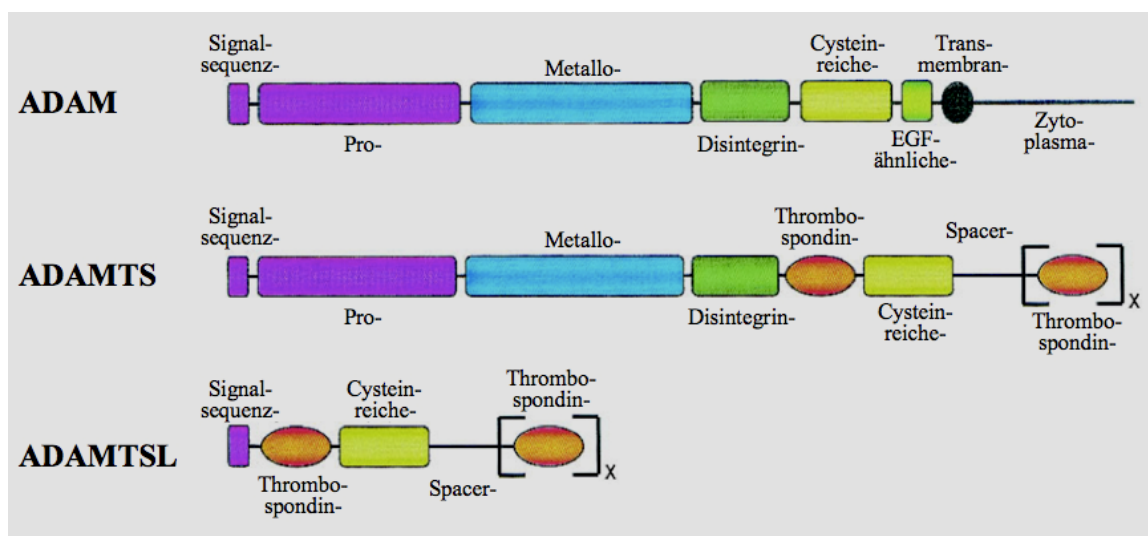


Abbildung 1.7 Domänenstruktur ADAM, ADAMTS und ADAMTSL (Seals and Courtneidge, 2003)

Auf spezielle Domänen und Motive (Cubilin-, gon-1-like-, Immunglobulin-ähnliche-, Lacunin- und Mucin-), die nur bei einzelnen ADAMTSs und ADAMTSLs vorkommen, wird hier nicht eingegangen. Der ADAMTSL-Prototyp entspricht in etwa der C-terminalen Hälfte der ADAMTS's (Porter et al., 2005).

Signalsequenz:

Sollen von Ribosomen synthetisierte Proteine nicht im Zytosol verbleiben, sondern auf zelluläre Kompartimente oder die Zellmembran verteilt werden, müssen sie im rauen endoplasmatischen Retikulum (rER) synthetisiert und von dort über den Golgi-Apparat, in dem sie noch modifiziert werden, „verschickt“ werden. Damit sie den Weg zum rER finden, müssen sie sozusagen adressiert werden. Dies geschieht über eine Signalsequenz, die sich bei den Proteinvorstufen (Prä-Proteine) N-terminal befindet und nach erfolgreicher Zustellung zum rER dort abgetrennt wird (Löffler, 2008). Die Mitglieder der drei verschiedenen ADAM-Familien besitzen solche Signalpeptide, was sich auch mit den gewonnenen Daten deckt, dass sie im rER synthetisiert und nach Reifung im Golgi-Apparat an ihre Bestimmungsorte gesendet werden (Porter et al., 2005; Seals and Courtneidge, 2003). Der Großteil der ADAM's scheint in Zellkernnähe lokalisiert zu sein. Jedoch werden auch einige an die Zelloberfläche transloziert. Bei einzelnen ADAMs (ADAM 9S, 10S, 12S, 28S) gibt es auch alternativ gespleißte kürzere Varianten, die sezerniert werden (Seals and Courtneidge, 2003). Bei den ADAMTSs und ADAMTSLs handelt es sich hingegen um regelhaft sezernierte Proteine (Porter et al., 2005).

Pro-Domäne:

Der Prodomäne kommen in erster Linie regulatorische Funktionen zu. Zum einen ist sie für die korrekte Faltung des Proteins mitverantwortlich. Zum anderen hält sie in vielen Fällen die Metalloproteasen-Domäne inaktiv. Auch scheint sie eine Rolle bei der Einschleusung in den sekretorischen Weg zu haben. Versuche mit ADAM-Pro-Proteinen, die keine Pro-Domäne enthielten, resultierten in katalytisch inaktiven Proteinen. Dies führte zur Annahme, dass sie bei der Faltung des Proteins, vor allem der Metalloproteasen-Domäne, eine Chaperonfunktion besitzen. Die Pro-Domäne der ADAM's enthält einen konservierten Cysteinrest. Dieser koordiniert zusammen mit den drei Histidinresten der konservierten Metzinkinsequenz (**HExxHxxGxxH**) das Zinkion der Metalloproteasen-Domäne und hält diese somit inaktiv. Wird die Pro-Domäne durch sog. Pro-Proteinkonvertasen wie z.B. Furin abgespalten, wird die Koordinationsstelle des

Cysteinrestes frei und die Metalloproteasen-Domäne aktiv (sog. Cystein-Switch). Spaltstelle für die Konvertasen ist ein konserviertes Rx(R/K)R-Motiv (R = Arginin, K = Lysin, x = variabel), das sich zwischen der Pro- und der Metalloproteasen-Domäne befindet. Stattzufinden scheint dieser Prozess im Golgi-Apparat. Er ist wahrscheinlich für den Großteil der ADAM's gültig. Bereits bekannte Ausnahmen bilden hier ADAM 8 und 28, die sich beide durch Autokatalyse aktivieren. Ein Einfluss der Pro-Domäne auf die Sekretion zeigte sich bei Versuchen mit ADAM 12S. Hier wurde ADAM 12S ohne Pro-Domäne nicht sezerniert (Seals and Courtneidge, 2003). Die Pro-Domäne der ADAMTS's reguliert ebenfalls deren Faltung, Aktivierung und Sekretion, jedoch enthalten die meisten ADAMTSs keinen konservierten Cysteinrest in ihrer Pro-Domäne. Das bedeutet, dass in diesen Fällen die Aktivierung nicht über einen Cystein-Switch stattfinden kann. Für die Abspaltung der Prodomäne existieren nicht nur die bekannte Rx(R/K)R-Sequenz, sondern noch weitere N-terminal gelegene Erkennungssequenzen, die eine sequentielle Regulation über die Pro-Domäne nahe legen. Anscheinend können auch einige ADAMTS-Vertreter trotz nicht abgespaltener Pro-Domäne katalytisch aktiv sein. Die Vertreter der ADAMTSL-Familie besitzen keine Pro-Domäne (Porter et al., 2005).

Metalloproteasen-Domäne:

Die Metalloproteasen-Domäne zählt wohl zu den populärsten Domänen der ADAM's und ADAMTS's. Sie ist Grundlage der Namensgebung und der Klassifikation und für diejenigen Funktionen verantwortlich, die die Vertreter der Familien so bekannt gemacht haben. Ihre grundlegende Funktion ist die Spaltung von Peptidbindungen unter Einlagerung von Wasser (Hydrolyse). Ihr enzymatisch aktiver Teil, das aktive Zentrum, ist eine Vertiefung, in der nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip passende Substrate umgesetzt werden. Für die Funktion der Metzinkine und damit auch der ADAM's und ADAMTS's ist die das katalytische Zentrum bildende Aminosäuresequenz **HExxHxxGxxH** (H = Histidin, E = Glutaminsäure, G = Glycin, x = variabel) entscheidend. Hier koordinieren drei Histidinreste und das für die Hydrolyse benötigte Wasser ein Zinkion, welches für die katalytische Wirkung essentiell ist. Der eigentlich katalytisch aktive Teil ist der Glutamatrest, der als katalytische Base fungiert. Der nach dem zweiten Histidinrest (von N- nach C-terminal) vorkommende Glycinrest erlaubt eine Biegung in der Faltstruktur des aktiven Zentrums, so dass der dritte Histidinrest an der Koordination des Zinks teilnehmen kann. Der weiter C-terminal in der Metalloproteasen-Domäne gelegene Methioninrest liegt

in einer Schleife (sog. Met-Turn) und bildet sozusagen ein hydrophobes Kissen für das Zinkion (Gomis-Ruth, 2009; Seals and Courtneidge, 2003; Wolfsberg et al., 1995a).

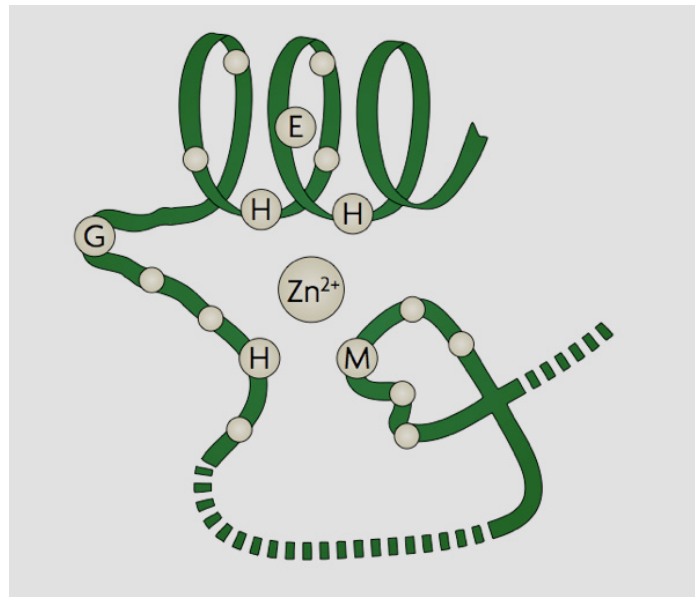


Abbildung 1.8 Aktives Zentrum der Metzinkine (Murphy, 2008)

H = Histidin, E = Glutaminsäure, G = Glycin, M = Methionin, Zn = Zink

Die Aktivierung der Metalloproteasen-Domäne geschieht nun entweder mittels Abspaltung der Pro-Domäne durch Pro-Proteinkonvertasen, durch Autokatalyse oder auf andere bisher noch nicht bekannte Weise. Ihre Inhibierung kann entweder durch Denaturierung, Chelatbildner, Hydroxamsäurederivate oder tissue inhibitors of metalloproteases (TIMP's) geschehen (Porter et al., 2005; Seals and Courtneidge, 2003). Im Gegensatz zu den ADAMTSs besitzen nur ca. 60 % der humanen ADAM's (8, 9, 10, 12, 15, 17, 19, 20, 21, 28, 30, 33) die konservierte Sequenz **HExxHxxGxxH** und sind damit katalytisch aktiv (Hooper, 2010; Seals and Courtneidge, 2003). Daher wird diese Domäne manches Mal auch als Metalloproteasen-ähnlich beschrieben (like). Doch auch in diesen Fällen zeigt sie Homologien zu der klassischen Metzinkin-Metalloproteasen-Domäne und wird allem Anschein nach auch ähnlich gefaltet (Wolfsberg et al., 1993, 1995a). Die ADAMTSL's besitzen keine Metalloproteasen-Domäne (Porter et al., 2005).

Disintegrin-Domäne:

Ebenfalls an der Namensgebung beteiligt und eine der bekannteren Domänen ist die Disintegrin-Domäne. Bekannt geworden ist sie durch die hämorrhagische Wirkung einiger Schlangengifte. Dort kommt sie in den schon erwähnten SVMPs vor, die ja ebenfalls zu

den Adamalysinen gezählt werden. Diese binden nach einem Schlangenbiss über ihre Disintegrin-Domäne an die auf der Oberfläche der Blutplättchen vorkommenden Integrine Glykoprotein IIb/IIIa und verhindern somit die Thrombozytenaggregation. Der Integrin-bindende Teil dieser Domäne ist eine aus 13 Aminosäuren bestehende Schleife, die im Falle der SVMPs an ihrer Spitze oft die Aminosäuresequenz RGD (R = Arginin, G = Glycin, D = Aspartat) enthält. Diese Sequenz ist jedoch kein „Muss“ und es kommen auch andere Sequenzen vor, die ebenfalls eine Integrinbindung vermitteln können. In der Tat besitzen die meisten ADAMs gar keine RGD-Sequenz in ihrer Disintegrin-Schleife (Blobel et al., 1992; Seals and Courtneidge, 2003). Bei den ADAMTSs findet sich nie eine RGD-Sequenz und es ist auch bei keinem Vertreter eine Interaktion mit Integrinen beschrieben. Obwohl ihre Disintegrin-Domäne große Ähnlichkeit zum SVMP-Prototyp mit seiner RGD-Sequenz besitzt, unterscheidet sie sich dennoch mehr oder weniger von diesem und wird deswegen auch oft als Disintegrin-like bezeichnet. Die ADAMTSLs besitzen keine Disintegrin-Domäne (Porter et al., 2005).

Cysteinreiche Domäne:

Die eigentliche Entdeckung der ADAM's gelang durch ihre Rolle bei der Fusion von Spermium und Eizelle. Damals schon erkannte Blobel, der an die Fusionsexperimente von Primakoff anknüpfte, dass ADAM 1 eine cysteinreiche Sequenz enthielt, die der Fusionssequenz von Rötelviren ähnelte. Er mutmaßte, dass diese Sequenz oder Domäne eine entscheidende Rolle bei der Fusion des Spermiums mit der Eizelle habe (Blobel et al., 1992). Leider ist über die genaue Funktion dieser Domäne auch heutzutage noch vieles unbekannt. Mittlerweile scheint es vielmehr, dass sie trotz ihrer Ähnlichkeit keine direkte Fusionsdomäne darstellt, sondern vielmehr die Funktion der Disintegrin-Domäne unterstützt und selbst sogar eine Funktion als Adhäsions-Domäne innehat. Versuche mit ADAM 13 haben gezeigt, dass Antikörper gegen die cysteinreiche Domäne die Bindung an Integrine inhibieren können. Weiters hat sich vor allem bei ADAM 12 gezeigt, dass die Domäne an Syndecane binden kann (Seals and Courtneidge, 2003). Syndecane sind Heparansulfat bindende Proteoglykane, die an der Zelloberfläche exprimiert werden und eine Rolle bei der Zelladhäsion, Proliferation und Migration spielen (Carey, 1997). Ein regulierender Einfluss auf die Metalloproteasen-Domäne wird bei ADAM 17 beschrieben (Hooper, 2010). Die cysteinreiche Domäne der ADAMTS's zeigt innerhalb dieser Familie eine starke Homologie und enthält 10 Cysteinreste (Porter et al., 2005).

EGF-ähnliche Domäne:

Über die Funktion dieser EGF-ähnlichen Domäne scheint bis heute fast nichts bekannt zu sein, da sie in der Literatur nur beim Aufbau am Rande erwähnt, nicht jedoch genauer beschrieben wird. Die Bezeichnung als black box durch Seals scheint hier eine treffende Bezeichnung (Seals and Courtneidge, 2003). ADAMTSs und ADAMTSLs besitzen keine EGF-ähnliche Domäne (Porter et al., 2005).

Transmembran-Domäne:

Die transmembranäre Domäne verankert die ADAMs in der Zellmembran. Kurze alternativ gespleißte Varianten der ADAM's (ADAM 9S, 10S, 12S, 28S) sowie die Vertreter der ADAMTSs und ADAMTSLs besitzen diese Domäne nicht und werden sezerniert (Porter et al., 2005; Seals and Courtneidge, 2003).

Zytoplasmatische Domäne:

Die zytoplasmatische Domäne der ADAM's ist sehr variabel und scheint eine Vielzahl verschiedener Funktionen zu haben. Die einzelnen ADAMs unterscheiden sich hier sowohl hinsichtlich der Domänenlänge als auch der Domänensequenz. Durch alternatives Spleißen entstehen Proteinvarianten ein und desselben Gens mit verschiedenen langen zytoplasmatischen Domänen. Sehr kurze Formen können auch sezerniert werden. Die zytoplasmatische-Domäne scheint eine Retentionsfunktion zu besitzen, da lange Varianten zurückgehalten werden. Durch Wechselwirkung mit Endophilin I und SH3PX1 scheint sie die Lokalisation und die Reifung der ADAM's zu steuern. Bei Endophilin und SH3PX1 handelt es sich um zwei Proteine, die beide eine Src homology 3-Domäne (SH3) besitzen und den Transport und die subzelluläre Lokalisation von Proteinen steuern. Sie scheinen damit auch die Reifung (Pro-Domänen-Abspaltung) der ADAM's im Golgi-Apparat zu beeinflussen. Ebenfalls scheint die zytoplasmatische Domäne einen regulativen Einfluss auf die Metalloproteasen-Domäne zu haben. Ihre Überexpression hemmt beispielsweise die Proteaseaktivität von ADAM 9. Doch nicht nur die Signalübertragung vom Zellinneren nach außen wird über diese Domäne geregelt, auch Signale von außen ins Zellinnere scheinen über diesen zytoplasmatischen Schwanz transduziert zu werden. Über die Bindung des mitotic arrest deficient 2 (MAD2) Proteins ist vielleicht sogar eine Koordination der ADAM Funktion mit dem Zellzyklus möglich. Die beschriebenen Funktionen werden entweder über Prolinmotive (PxxP) innerhalb des Schwanzes vermittelt, die in der Lage sind Proteine über deren SH3-Domänen zu binden, oder über

Motive innerhalb dieser Domäne, die von Kinasen phosphoryliert werden können. Durch diese Phosphorylierung wird die Domäne entweder direkt aktiviert oder die phosphorylierten Reste dienen als Angriffspunkt für SH2-Domänen enthaltende Proteine (Howard et al., 1999; Seals and Courtneidge, 2003). Beschriebene Interaktionen dieser Domäne mit Aktinin scheinen bei Fusionsprozessen von Myoblasten eine Rolle zu spielen (Hooper, 2010). Die Vertreter der ADAMTS- und ADAMTSL-Familien besitzen als sezernierte Proteine diese Domäne nicht (Porter et al., 2005).

Thrombospondin-Domäne:

Diese Domäne enthält das Thrombospondinmotiv Typ I und kommt nur bei den Vertretern der ADAMTS- und ADAMTSL-Familien vor. Alle ADAMTSs und ADAMTSLs besitzen im Anschluss an ihre Disintegrin-Region eine Thrombospondin-Domäne. Je nach Vertreter können sich bis zu 14 weitere Thrombospondinmotife an die Spacer-Domäne anschließen. Diese können wiederum von speziellen Domänen/Motiven unterbrochen oder gefolgt werden. Da diese speziellen Domänen jedoch nur bei einzelnen Vertretern vorkommen, wurden sie zu Beginn nur erwähnt (siehe funktioneller Aufbau) und werden nicht genauer beschrieben. Der Aufbau der Thrombospondine (TSP's) soll jedoch Erwähnung finden, da Teile dieser die Thrombospondin-Domäne der ADAMTSs und ADAMTSLs aufbauen und in der ADAM-Literatur trotz ihrer wichtigen Funktion und ihres komplexen Aufbaus nur am Rande erwähnt werden. Thrombospondine sind Glykoproteine, die aus homologen Untereinheiten aufgebaut sind und sezerniert werden. Die Untereinheiten bestehen wie die Adamalysine aus mehreren Domänen mit konservierten Sequenzen. Thrombospondin 1 wurde bei der Stimulation von Thrombozyten mit Thrombin entdeckt und fand so seinen Namen. Seither sind noch vier weitere Vertreter bekannt, so dass es nun Thrombospondin 1, 2, 3, 4 und 5 gibt. Im Weiteren sollen nur TSP 1 und 2 besprochen werden, da nur diesen beiden das sog. Typ I Motiv enthalten, das auch in den ADAMTSs und ADAMTSLs vorkommt. TSP 1 und 2 bestehen aus drei untereinander homologen Untereinheiten. Aufgrund ihrer Homologie zueinander werden TSP 1 und 2 zur Untergruppe A der Thrombospondine zusammengefasst. Von N- nach C-terminal sind die Untereinheiten folgendermaßen aufgebaut: Beginnend mit einer eher variablen nicht sehr homologen Domäne, die die für die Verbindung der homologen Untereinheiten nötigen Cysteinreste enthält, folgt eine Prokollagen-homologe Domäne. Im Anschluss daran kommt eine Domäne mit drei sog. Typ I Repeats, die unglücklicherweise auch Thrombospondin Repeats (TSRs) genannt werden. Die darauf folgenden Abschnitte sind

unter allen TSPs sehr homolog, während die zuvor beschriebenen Domänen unter allen Vertretern stärker variieren. Es folgen bei TSP 1 und 2 drei EGF-ähnliche Typ II Repeats, sieben Calcium-bindende Typ III Repeats, die eine RGD-Sequenz enthalten, und eine globuläre Domäne als Abschluss.

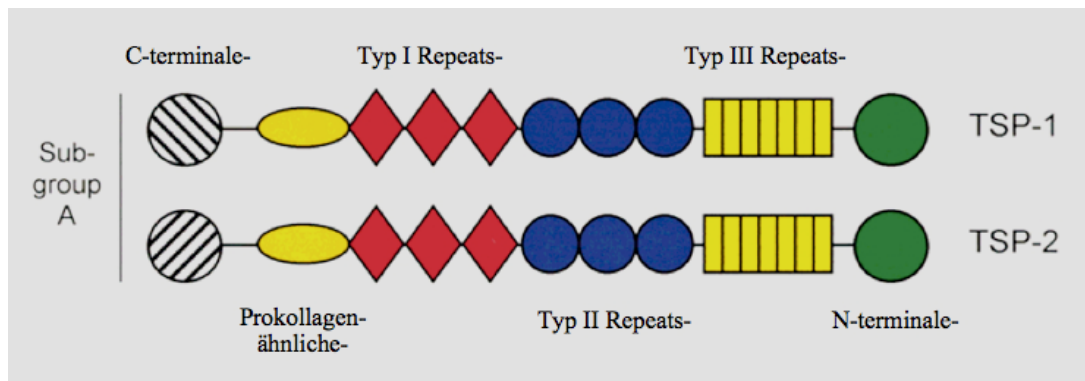


Abbildung 1.9 Domänenstruktur Thrombospondin (Adams and Tucker, 2000)

TSP Typ I Motive kommen nun auch in anderen Proteinen vor, wie beispielsweise Komplementfaktoren oder eben den ADAMTSs und ADAMTSLs. TSP Typ I Motive sind in der Lage an extrazelluläre Matrix (Kollagen, Fibronectin) und an Zellen über den Thrombospondinrezeptor CD36 oder Heparansulfate und andere Glykosaminoglykane zu binden. Außerdem vermögen sie TGF- β zu aktivieren. So werden Zellproliferation, Migration und auch die Neoangiogenese über dieses Motiv mitgeregelt. Im Falle der ADAMTSs scheint also die Fähigkeit dieser Familie, an die extrazelluläre Matrix zu binden, durch die Thrombospondin-Domäne vermittelt. Diese Fähigkeit unterscheidet die ADAMTSs von den ADAMs und MMPs (Adams and Tucker, 2000; Porter et al., 2005).

Spacer-Domäne:

Über diese Platzhalterregion ist nicht sehr viel bekannt. Sie kommt nur bei den Mitgliedern der ADAMTS- und ADAMTSL-Familien vor und zeigt im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Domänen keine Homologien zu bereits bekannten Proteinsequenzen. In ihrer Länge ist sie zwischen den einzelnen Mitgliedern sehr variabel. Von der cysteinreichen Domäne, an die sie anschließt, grenzt sie sich durch die Abwesenheit von Cysteinresten ab. Funktionell scheint sie wie die Thrombospondin-Domäne die Bindung extrazellulärer Matrix zu vermitteln. Weiters werden einige ADAMTSs anscheinend im Bereich der Spacer-Region C-terminal prozessiert, so dass verschieden lange Isoformen mit verschiedenen Spezifitäten entstehen. Wie sich vor allem bei ADAMTS 4 gezeigt hat,

verlieren manche Isoformen ihre Bindungsfähigkeit an die extrazelluläre Matrix, zeigen verschiedene Proteasenaktivitäten oder ihre Substratspezifität ändert sich. Auch variiert ihre Erkennung von Spaltsequenzen innerhalb ein und desselben Substrats. Versuche haben gezeigt, dass die antiangiogenen Eigenschaften von ADAMTS 1 auch von seiner Länge und damit vom Vorhandensein der Spacer- und Thrombospondin-Domänen abhängen. Bei dieser C-terminalen Prozessierung scheinen Matrixmetalloproteasen involviert zu sein und diesen Prozess mit zu steuern (Hurskainen et al., 1999; Porter et al., 2005).

1.4.4 Funktionen

So komplex wie ihr Aufbau sind auch die Funktionen der Mitglieder der drei Familien. Da eine genaue Beschreibung bei der Vielzahl der Mitglieder und deren Funktionen den Rahmen sprengen würde, werden sie hier nur erwähnt. Mit ihrer Metalloproteasen-Domäne spielen die ADAMs eine wichtige Rolle bei sämtlichen Regelprozessen im Körper. Bekannt sind die ADAMs für ihre Fähigkeit, die Membranverankerung von Funktionsproteinen zu kappen und diese damit von der Zelloberfläche freizusetzen (sog. shedding), weshalb sie auch Sheddases genannt werden. Die freigesetzten Proteine können dann ihrer physiologischen Bestimmung nachkommen. Dieser Mechanismus stellt neben dem Transkriptionslevel eine weitere Möglichkeit dar, funktionelle Proteine zu regulieren. Bekannte Substrate sind hier Zytokine und deren Rezeptoren. ADAM 17 sheddet beispielsweise neben TNF- α auch noch IL 1 und 6 sowie deren Rezeptoren. Auch Wachstumsfaktoren sowie deren Rezeptoren werden über diesen Mechanismus reguliert. Bekannte Vertreter sind hier ADAM 9, 12, 19 und wieder ADAM 17, sowie deren Substrate aus der Familie der EGF-Rezeptoren samt einigen Liganden. Moleküle wie L-Selektin und L1, die bei Adhäsionsprozessen eine Rolle spielen, oder wie der Notch-Rezeptor samt Delta-Ligand, die bei Zell zu Zell-Hemmungen (laterale Inhibition) wichtig sind, fallen ebenfalls ins Sheddingspektrum (ADAM 10, 17). Neben dem shedding (dem „Ab-spalten“) spalten die ADAMs auch Moleküle zu deren Prozessierung oder Abbau, wie etwa das insulin like growth factor binding protein 3 und 5 (IGFBP) (ADAM 12, 28), Prionen (ADAM 10, 17) oder das amyloid precursor protein (ADAM 9, 10, 17). Auch die Degradierung extrazellulärer Matrix gehört zu den Funktionen der ADAM's (ADAM 9, 10, 12, 13, 15) und regelt zusammen mit der Prozessierung von Chemokinen, Adhäsionsmolekülen und deren Rezeptoren das Aussproßen und die Migration von Zellen.

Die ebenfalls in diesen Prozess involvierten Disintegrin- und cysteinreichen Domänen der ADAM's beteiligen sich darüber hinaus auch an Zellfusionsprozessen wie bei der Fertilisation (ADAM 2) oder der Fusion von Myoblasten (ADAM 12). Im Zusammenhang mit der Fertilisation soll noch erwähnt sein, dass ein Großteil der ADAM's im Hoden exprimiert wird (Mochizuki and Okada, 2007; Seals and Courtneidge, 2003). Die Verwandten der ADAM's, die ADAMTSs, zeichnen sich nun dadurch aus, dass sie sezerniert werden und an die extrazelluläre Matrix binden können. Hier üben sie auch einen Großteil ihrer Funktionen aus. Zum einen sind sie am Aufbau der extrazellulären Matrix beteiligt, indem sie Prokollagen zu Kollagen prozessieren (ADAMTS 2, 3, 14). Zum anderen degradieren sie die extrazelluläre Matrix, indem sie Proteoglykane wie Aggrecan, Versican oder Brevican spalten (ADAMTS 1, 4, 5, 8, 9, 15), was den genannten Vertretern auch den Namen Aggrecanasen eingebracht und sie populär gemacht hat. Eine weitere sehr populäre Funktion ist die Rolle von ADAMTS 13. ADAMTS 13 baut den von Willebrand Faktor ab und reguliert somit die Blutgerinnung. Als letztes soll noch die anti-angiogene Wirkung von ADAMTS 1 und 8 genannt sein. Beide inhibieren die VEGF und FGF induzierte Angiogenese. Die Funktion der ADAMTSL-Vertreter ist bisher noch nicht bekannt. Es wird angenommen, dass sie eine Rolle bei Adhäsionsprozessen oder der Regulation der ADAMTS's haben (Porter et al., 2005). Die Vertreter der ADAM- und ADAMTS-Familien haben nicht nur physiologische Aufgaben, sondern spielen auch eine Rolle in pathologischen Prozessen wie Inflammation, Degeneration und auch Krebs (Porter et al., 2005; Seals and Courtneidge, 2003). Ihr dortiger Stellenwert wird langsam immer deutlicher.

2 Zielsetzung

Hauptziel dieser Arbeit war es, mittels Reverser Transkriptase PCR (RT-PCR) nach dem Vorkommen von ADAM-, ADAMTS- und ADAMTSL-Vertretern in den vier Chorioncarcinomlinien Jar, Jeg3, Bewo und Ach3p zu screenen. Da die Mitglieder dieser Protein-Familien an der Entstehung und Progression von malignen Tumoren entscheidend beteiligt zu sein scheinen, wollten wir ein Expressionsprofil dieser Vertreter erstellen, um zu evaluieren, welche Mitglieder in Zukunft mittels funktioneller Experimente genauer untersucht werden könnten. Aufgrund der einleitend beschriebenen interessanten Parallelen zwischen malignen Tumorzellen und Trophoblasten entschieden wir uns, für das Screening die genannten vier Chorioncarcinomlinien als Trophoblastenmodell heranzuziehen. Zu diesem Zwecke wurden die vier Zelllinien angezchtet. Nach RNA-Isolierung wurde dann gezielt nach dem Vorkommen der einzelnen Vertreter gesucht. Falls sich einzelne Mitglieder hinsichtlich ihres Vorkommens als interessant zeigen sollten, war ein Nebenziel, diese genauer mittels quantitativer Realtime PCR und Immunfluoreszenz zu untersuchen.

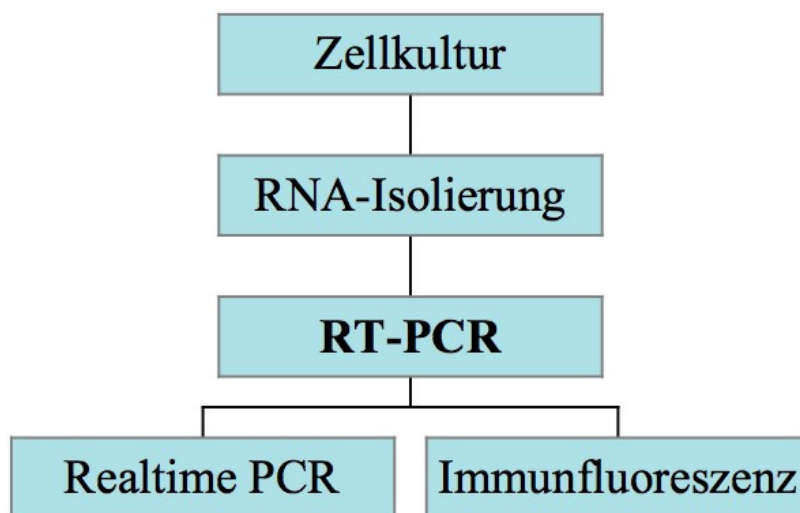


Abbildung 2.1 Aufbau Diplomarbeit

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultur

Zu Beginn der Arbeit wurden die vier Chorioncarcinomzelllinien Jar, Jeg3, Bewo und Ach3p angezüchtet. Hierzu wurden die Zellen aufgetaut, vermehrt und dann entweder zum Isolieren der RNA geerntet oder für spätere Versuche wieder tiefgefroren. Der Umgang mit den Zellen erfolgte stets unter sterilen Bedingungen. Stets wurden saubere Laborkleidung und Handschuhe getragen, auch wurden die Hände, Arbeitsflächen, Geräte und Gebrauchsmaterialien vor der Arbeit gereinigt und mit 75 % Alkohol desinfiziert. Die Arbeit mit den Zellen und allen Materialien, die mit diesen in Berührung kamen, fand unter einer sterilen Werkbank mit Luftströmung und UV-Licht-Ausstattung statt.

3.1.1 Geräte, Gebrauchsmaterial, Chemikalien, Lösungen, Kulturmedien

Tabelle 3-1 Geräte Zellkultur

Gerätemodell	Hersteller
Brutschrank HERAcell 240	Heraeus Instruments
Inversionsmikroskop Eclipse TE 300	Nikon
Kamerasystem digital sight DS-L1	Nikon
Kühlschrank +4 und -20 °C	Liebherr
Tiefkühltruhe Hera HFC -86 °C	Heraeus
Lichtmikroskop BX40F-3	Olympus
Luminometer Mediators PhL	Mediators Diagnostika
Magnetmixer Ikamag Ret	Ika
Pipetten Pipetman P10, P20, P200, P1000	Gilson
Pipettierhilfe Express	Falcon
Sterilisator ST 6420	Heraeus Instruments
Sterilwerkbank HERAsafe	Heraeus Instruments
Stickstofftank	Chart Industries
Waage SBC 21	Scaltec Instruments
Wasserbad DC 5	Haake
Zentrifuge GS 6	Beckman

Tabelle 3-2 Gebrauchsmaterial Zellkultur

Gebrauchsmaterial	Hersteller (Katalognummer)
Glasbehälter x ml	Schott
Kryoröhrchen 2 ml	Carl Roth GmbH (E292.1)
Kulturflaschen 75 cm ²	Sarstedt (83.1813.002)
Kulturgefäß quadriPerm (Heraeus)	Sigma-Aldrich (Z376760)
Magnetstab	?
Mykoplasmentest Myco Alert	Lonza (LT07-218)
Objektträger 76x26 mm geschnitten	Carl Roth GmbH (H868)
Objektträgerbox	?
Parafilm M	America National Can (?)
Petrischale glas (autoklaviert)	?
Pinzette anatomisch (autoklaviert)	?
Pipettenspitzen (autoklaviert) 200 µl	Carl Roth GmbH (B007.1)
Pipettenspitzen serologisch 1 ml	Costar (4011)
5 ml	Sarstedt (86.1253.001)
10 ml	Sarstedt (86.1254.001)
25 ml	Sarstedt (86.1685.001)
Röhrchen konisch 15 ml	Falcon (352097)
50 ml	Falcon (352098)
Spritze 20 ml	?
Ständer für Reaktionsgefäße	neoLab (2-1969)
Spritzenfilter steril PVDF 0,22 µm	Carl Roth GmbH(P666.1)
96 „well“ Mikrotiterplatte	Sarstedt (83.1835)

Tabelle 3-3 Chemikalien und Lösungen Zellkultur

Chemikalie, Lösung	Hersteller (Katalognummer)
Accutase	PAA (L11-007)
Alpha D-Glucose Monohydrat	Carl Roth GmbH(67801)
Azaserin	?
DMEM	GIBCO (22320)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (D2650)
Fetales Kälberserum Gold (FKS)	PAA (A11-151)
HAMS F12 ohne L-Glutamin	PAA (E15-016)
HBSS	GIBCO (14175)
HEPES Puffer 1M	PAA (S11-001)
Hypoxanthin	?
L-Glutamin 200 mM	PAA (M11-004)
MEM with Earle's Salt ohne L-Glutamin	PAA (E15-024)
Natriumpyrovat 100 mM	PAA (S11-003)
Nicht essentielle Aminosäuren 100x	PAA (M11-003)
Penicillin-Streptomycin (P/S)	GIBCO (15140-122)
RPMI 1640 ohne L-Glutamin	PAA (E15-039)
Selbsthergestellte Lösung	Zusammensetzung
Alpha D-Glucose [250 g/L] (sterilfiltriert)	100 ml aqua bidestillatum +25 g alpha D-Glucose

Bei der Zusammensetzung der Kulturmedien wurden die Empfehlungen der American Type Culture Collection (ATCC), sowie die Kulturmedienverwendung in den Artikeln von Hiden (2007) und von Wolfe (2006) berücksichtigt.

Tabelle 3-4 Kulturmedien Zellkultur

Zelllinie	Zusammensetzung
Jar	100 ml RPMI 1640 +10 ml FKS +1 ml P/S +1 ml L-Glutamin +1 ml Na-Pyrovat +1 ml D-Glucose +1 ml HEPES
Jeg3	100 ml MEM +10 ml FKS +1 ml P/S +1 ml L-Glutamin +1 ml Na-Pyrovat +1 ml NEAS
Bewo	100 ml HAMS F12 +10 ml FKS +1 ml P/S +1 ml L-Glutamin
Bewo	100 ml HAMS F12/DMEM 1:1 +10 ml FKS +1 ml P/S +1 ml L-Glutamin
Ach3p	100 ml HAMS F12 +10 ml FKS +1 ml P/S +1 ml L-Glutamin
Ach3p Selektions- medium	100 ml HAMS F12 +10 ml FKS +1 ml P/S +1 ml L-Glutamin +5,7 µM Azaserin +100 µM Hypoxanthin

Die von uns verwendeten Zelllinien wurden nach den grundlegenden Prinzipien der Zellkultur kultiviert. Diese versucht die Bedingungen in vivo in standardisierter Art und Weise in vitro nachzubilden, um ein Milieu zu schaffen, in dem Zellteilung, Zellwachstum, Differenzierung und Ausübung der Zellfunktion möglich sind. Zu diesem Zwecke müssen den Zellen essentielle Substanzen angeboten, „Abfallprodukte“ neutralisiert und entfernt und die Zellen vor Erregern geschützt werden. Zudem muss all dies in einem relativ konstanten und feuchtwarmen Umfeld, wie es auch lebende Organismen bieten, stattfinden. Konstanz sollte hier vor allem hinsichtlich des Stoffangebotes, der Osmolalität (ca. 300 mosmol/kg H₂O), des pH's (7,2-7,4) und der Temperatur (37 °C) herrschen. Die Bereitstellung essentieller Substanzen erfolgt über die Verwendung von Kulturmedien. Irreführenderweise wird der Begriff Medium oder Kulturmedium oft sowohl für die wässrige Grundlösung als auch für die fertige Rezeptur benutzt, die nach Hinzufügen noch weiterer Substanzen wie z.B. Serum entsteht. Aus diesem Grund erfolgt in dieser Arbeit eine Unterscheidung in Basismedium (= wässrige Grundlösung) und Kulturmedium (= fertige Kulturmedienrezeptur). Die Basismedien bestehen aus Wasser, anorganischen Salzen, Aminosäuren, Vitaminen und sonstigen Substanzen wie z.B. D-Glucose und Phenolrot als pH-Indikator. Die verschiedenen Basismedien unterscheiden sich meist nur in der Anzahl und der Konzentration der Inhaltsstoffe. Bei den anorganischen Salzen spielt unter anderem NaHCO₃ eine wichtige Rolle. Im Zusammenspiel mit der CO₂-Begasung im Brutschrank regelt es den pH und puffert saure Metabolite ab, die beim Zellstoffwechsel entstehen. Die hier verwendeten Basismedien weisen allesamt einen relativ hohen Gehalt an NaHCO₃ auf (sog. Pufferung nach Earle) und sind somit für schnell wachsende Kulturen geeignet. Dies macht jedoch auch eine Begasung mit CO₂ nötig, um gerade zu Beginn den zu hohen pH zu puffern. Unter den Aminosäuren ist L-Glutamin hervorzuheben, da es zumeist die wachstumsbegrenzende Aminosäure darstellt. Bei 37 °C wird es nicht nur enzymatisch abgebaut, sondern es zerfällt auch nichtenzymatisch zu Pyrrolidon-Carbonsäure und Ammoniak. Folglich begrenzt nicht nur der Mangel an Glutamin, sondern auch die Anhäufung des Zellgiftes Ammoniak das Zellwachstum. Da für diese Arbeit keine glutaminhaltigen Dipeptide verwendet wurden, die dieses Problem „umgehen“, wurden die Kulturmedien jedes Mal frisch zu je 100 ml angesetzt und nach Gebrauch bei 4 °C gelagert. Ein weiterer wichtiger Bestandteil in der Zusammensetzung ist Blutserum. Es enthält neben einer Vielzahl wichtiger Inhaltsstoffe (Eiweiße, Zucker, Fette, Mineralien und Spurenelemente...) vor allem auch Wachstumsfaktoren, Hormone und

Anheftungsfaktoren (z.B. Fibronectine). Es kann jedoch auch unerwünschte Stoffe wie Toxine, Erreger und Abwehrstoffe enthalten. Wir verwendeten fetales Kälberserum, welches reich an Wachstumsfaktoren und Fructose ist und im Vergleich zum Serum von neugeborenen Kälbern weniger Immunglobuline enthält. Das von uns verwendete Serum garantiert laut Hersteller unabhängig von der Charge eine gleichbleibende Qualität. Als drittes in der relativ konstanten Zusammensetzung von Kulturmedien werden Antibiotika eingesetzt. Sie ersetzen das in vitro nicht vorhandene Immunsystem, nicht jedoch eine peinlich genaue Sterilität im Umgang mit den Zellen. Standardmäßig findet eine Mischung aus Penicillin G (10 000 U/ml) gegen grampositive Bakterien und Streptomycin (10 000 µg/ml) gegen grampositive und negative Bakterien Anwendung. Bei Viren, Pilzen und vor allem Mykoplasmen zeigt dieses Kombinationspräparat jedoch keine ausreichende Wirkung. Ferner ist zu beachten, dass es auch zytotoxische Effekte besitzt. Als Zusätze für stark proliferierende Kulturen können auch noch D-Glucose und Na-Pyrovat als Energiequellen verwendet werden. Ebenfalls stellen nichtessentielle Aminosäuren sowohl einen geeigneten Pool zur Energiegewinnung als auch zur Proteinbiosynthese dar. Bei Zellen, die die Fähigkeit zur Produktion dieser Aminosäuren verloren haben, sind sie obligat (4) (Lindl, 2002).

3.1.2 Zelllinien Jar, Jeg3, Bewo und Ach3p

Jar:

ATCC-Nummer: HTB 144

Zelltyp: humanes Chorioncarcinom

Ursprungsgewebe: Plazenta

Morphologie: epithelial

Wachstumsform: adhärent

Karyotyp: pseudotriploid, modale Chromosomenanzahl 68

Produkte: hCG, hPL, Östrogen, Progesteron

Etablierung: Roland Pattillo (5)

Jeg3:

ATCC-Nummer: HTB 36

Zelltyp: humanes Chorioncarcinom

Ursprungsgewebe: Woods Stamm des Erwin-Turner Tumors

Morphologie: epithelial

Wachstumsform: adhärent

Karyotyp: hypertriploid, modale Chromosomenanzahl 71

Produkte: hCG, hPL, Progesteron

Etablierung: Peter Kohler und William Bridson (6)

Bewo:

ATCC-Nummer: CCL 98

Zelltyp: humanes Chorioncarcinom

Ursprungsgewebe: Woods Stamm des Erwin-Turner Tumors

Morphologie: epithelial, teilweise auch synzytial

Wachstumsform: adhärent

Karyotyp: hypotetraploid, modale Chromosomenanzahl 86

Produkte: hCG, hPL, Östrogen, Progesteron, Keratin

Etablierung: Roland Pattillo und George Gey (7)

Ach3p:

Zelltyp: immortalisierte Trophoblastenhybride

Ursprungsgewebe: Chorioncarcinomzelllinie Ac1-1 und Erstsemestertrophoblasten

Morphologie: epithelial

Wachstumsform: adhärent

Karyotyp: hypertetraploid, Chromosomenanzahl 94-98, männlich

Produkte: hCG, Zytokeratin 7, teilweise HLA-G

Etablierung: Ursula Hiden und Mitarbeiter (Hiden et al., 2007)

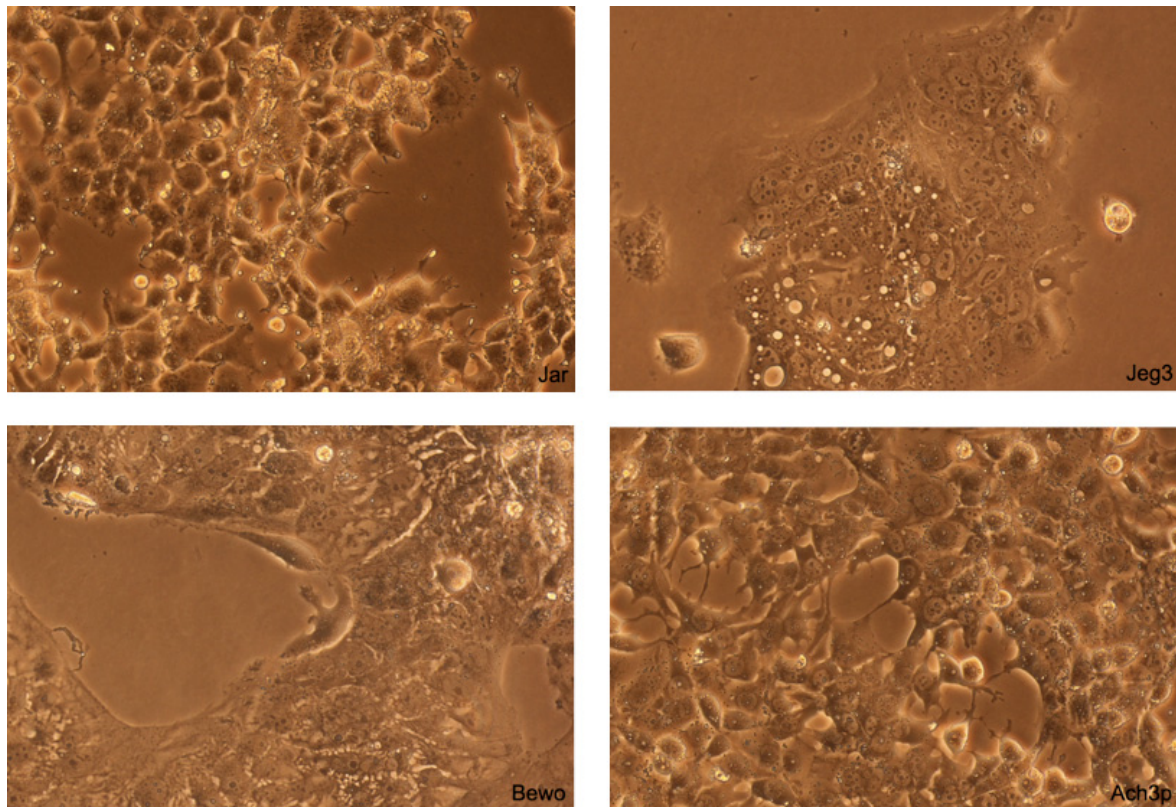


Abbildung 3.1 Nativaufnahmen Jar, Jeg3, Bewo und Ach3p (Phasenkontrast 200x)

3.1.3 Auftauen, Kulturmedienwechsel, Splitten, Einfrieren, Mykoplasmentest, Anzucht zur Immunfluoreszenzfärbung

Auftauen der Zellen:

Werden Zellen aktuell für Versuche nicht benötigt, können sie durch Tiefrieren bei -196 °C in flüssigem Stickstoff konserviert werden (sog. Kryokonservierung). Vorteile dieser Methode sind neben einer Arbeits- und Kostenersparnis auch ein Schutz vor Kontamination und genomischer Variabilität. Bei solch tiefen Temperaturen sind lebende Zellen vollkommen inert und können über Jahre gelagert werden. Damit die Zellen jedoch den Einfrierprozess überleben, müssen „Frostschutzmittel“ wie z.B. Glycerin oder Dimethylsulfoxid (DMSO) hinzugefügt werden (Lindl, 2002). Die hier verwendeten Zelllinien waren allesamt mit DMSO versetzt eingefroren. Es handelt sich um eine an sich wenig toxische Substanz, die wegen ihrer gut penetrierenden Eigenschaften gern als Frostschutz eingesetzt wird. Bei höheren Temperaturen und in der eingesetzten Konzentration von zumeist 10 % zeigt jedoch auch DMSO toxische Wirkungen. Dies ist der Grund für die Empfehlung, Zellen zumeist möglichst schnell aufzutauen, um damit das Frostschutzmittel rasch verdünnen und/oder entfernen zu können. Desweiteren ist beim

Auftauen Eile geboten, da es während eines zu langsamen Auftauprozesses, bei Temperaturen um $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$, intrazellulär zu einer schädigenden Eiskristallbildung kommen kann (sog. Rekrystallisation), obwohl die Temperatur ansteigt (Mazur and Schmidt, 1968; Pegg, 2002). Das Auftauen der in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen geschah nun wie folgt:

Nach der Entnahme der Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank wurde der Deckel des Röhrchens um ca. eine halbe bis ganze Umdrehung geöffnet, um den Überdruck auszugleichen, der durch die schnelle Erwärmung des Inhalts entsteht. Bis zum Erreichen des Wasserbades wurde das Röhrchen kurz auf Eis gestellt. Dann wurde es gerade solange in ein auf $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ vorgewärmtes Wasserbad gehalten bis das letzte Eisklumpchen verschwunden war. Nun wurde, um das DMSO zu verdünnen, nach Desinfektion des Kryoröhrchens der Inhalt sogleich unter einer Sterilwerkbank mittels Pipette in ein 15 ml Röhrchen überführt, in das zuvor 10 ml fertiges $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ warmes Kulturmedium je nach Zelllinie vorgelegt wurden. Nach Zentrifugation für 5 min bei 1000 rpm, wurde dann der Überstand unter der Werkbank abgesaugt und das übrig gebliebene Zellpellet mit 1 ml $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ warmen Kulturmedium resuspendiert und unter dreifachem Auf- und Abschwemmen in eine 75 cm^2 Kulturflasche pipettiert, in die zuvor 11 ml jeweiliges $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ warmes Kulturmedium vorgelegt wurden. Zum Schluss wurden die Zellen noch unter dem Mikroskop bezüglich Zell- und Detritusanzahl und ihrer homogenen Aufschwemmung kontrolliert, bevor sie bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $5\text{ }\%$ CO_2 inkubiert wurden.

Kulturmedienwechsel und Splitten der Zellen:

Das Kulturmedium wurde je nach Wachstumsgeschwindigkeit und Anzahl der Zellen alle 2-4 Tage gewechselt. Hierzu wurde das alte Kulturmedium unter der Werkbank abgesaugt und 12 ml neues $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ warmes Kulturmedium je nach Zellart vorsichtig hinzugefügt. Vor und nach dem Wechsel wurden die Zellen hinsichtlich ihres Wachstums, des Gehalts an Detritus, ihrer Morphe und Anzeichen einer Kontamination unter dem Mikroskop beurteilt. Anschließend wurden die Zellen wieder bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $5\text{ }\%$ CO_2 inkubiert. Die Hybridlinie Ach3p wurde nach 12 Tagen zweitägig in Selektionsmedium inkubiert. Bei der Zelllinie Bewo wurde in der zweiten Passage das Kulturmedium von HAMS F12 auf 1:1 HAMS F12/DMEM umgestellt, da sich der Zustand der Zellen verschlechterte und in der Literatur die Anzucht mit dieser Medienkombination ebenfalls beschrieben ist (Wolfe, 2006). Ausgehend von einer Rasendichte von ca. $80\text{ }\%$ bildete sich plötzlich unter Kultur mit

HAMS F12 viel Detritus und es begannen sich größere Zellrasenplatten abzuheben. Zudem verfärbte sich das Kulturmedium schneller gelb. Es gab mikroskopisch keine Hinweise auf Bakterien- oder Pilzbefall und auch die zweimalige Testung auf Mykoplasmen mittels MycoAlert Mycoplasma Detection Kit der Firma Lonza war negativ. Ca. 12 Tage nach Kulturmedienumstellung begannen sich die Zellen wieder zu erholen und zeigten eine deutliche Proliferation, so dass sie nach 7 Tagen wieder gesplittet werden konnten. Die Häufigkeit des Splittens war abhängig vom unterschiedlich schnellen Wachstum der verschiedenen Zelllinien. In der Regel erfolgte es bei einer unter dem Mikroskop geschätzten Zellrasendichte von über 90 %. Zum Splitten oder Passagieren von adhären wachsenden Zellen, können diese, wenn eine genügende Dichte der Zellen gegeben ist, mittels Enzymen (Trypsin, Chymotrypsin, Accutase...) und evtl. EDTA vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst und auf neue Kulturgefäße verteilt werden. Diese Enzyme oder genauer Proteasen dauern dabei sozusagen die Zelladhäsionsproteine an und lösen somit die Verbindung der Zellen zum Untergrund. Da es sich bei diesen Proteasen um Substanzen von lebenden Organismen handelt, ist ihr Wirkungsoptimum bei Temperaturen im Bereich der Körpertemperatur. EDTA unterstützt die proteolytische Aktivität, indem es Ionen wie beispielsweise Calcium bindet. Diese Ionen sind für die Interaktion von Desmosomen und Proteinen der extrazellulären Matrix (Fibronectin, Kollagen, Laminin) von Bedeutung, indem sie deren Bindung vermitteln.

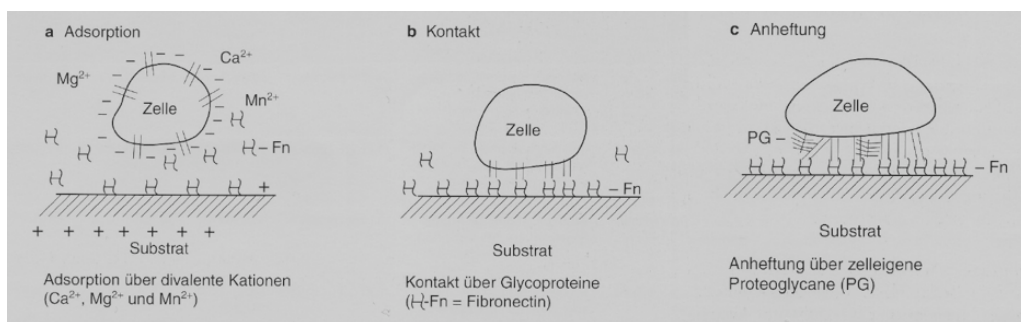


Abbildung 3.2 Anheftungsvorgang adhären wachsender Zellen (Lindl, 2002)

Um größere Schädigungen der Zellen durch die Proteasen und das EDTA zu verhindern, sollten sie nur so lang wie nötig angewendet werden. Vor ihrer Anwendung sollte man berücksichtigen, dass Kälberserumproteasen des Kulturmediums die zur Ablösung der Zellen verwendeten Enzyme inaktivieren können. Daher sollte man das Kulturmedium vor

dem Ablöseprozess entfernen und die Zellen „waschen“ (Boxberger, 2006; Lindl, 2002). Das Vorgehen beim Passagieren war nun folgendes:

Unter der Sterilwerkbank wurde zuerst das alte Kulturmedium abgesaugt und die Zellen wurden mit 10 ml 37 °C warmen HBSS-Puffer gewaschen. Sprich das Kulturgefäß wurde ein paar Mal vorsichtig hin und her geschwenkt und anschließend wurde der Puffer nach ca. einer halben Minute wieder abgesaugt. Nun wurden 5 ml 37 °C warme Accutase hinzugefügt und die Zellen für 10 min inkubiert. Laut Hersteller PAA soll Accutase ein sehr schonendes Ablösen der Zellen gewährleisten. Während der Inkubation wurde nach 5-7 min der Fortschritt der Zellablösung unter dem Mikroskop kontrolliert. Spätestens nach 10 min wurden die Zellen nochmals unter dem Mikroskop betrachtet und falls nötig wurde mit dem Kulturgefäß 3-4 Mal vorsichtig auf eine Unterlage geklopft, damit schließlich alle Zellen abgelöst waren. Dann wurden unter der Werkbank 8 ml 37 °C warmes Kulturmedium je nach Zellart hinzugefügt, um die Wirkung der Accutase zu neutralisieren und das in ihr enthaltene EDTA zu verdünnen. Obgleich dieser Schritt laut Hersteller nicht nötig ist, da sich Accutase selbst verdaut (8). Nun wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Röhrchen pipettiert und dieses wurde für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Unter der Werkbank wurde der Überstand dann abgesaugt und das Zellpellet vorsichtig mit 2 ml 37 °C warmen Kulturmedium entsprechend der jeweiligen Zelllinie resuspendiert. Hierauf wurde je 1 ml der Zellsuspension auf eine neue 75 cm² Kulturflasche aufgeteilt, in die zuvor 11 ml des jeweiligen ebenfalls auf 37 °C erwärmten Kulturmediums pipettiert wurden. Nach dreimaligem vorsichtigen Auf- und Abschwemmen der Zellen in der Kulturflasche, um eine gleichmäßige Verteilung von Einzelzellen zu erreichen, fand zuletzt nochmals eine Kontrolle unter dem Mikroskop statt, bevor die Zellen wieder bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert wurden.

Zellernte und Einfrieren der Zellen:

Zur Langzeitkonservierung können Zellen bei -196 °C in flüssigem Stickstoff über Jahre gelagert werden, ohne dass es zu einem gravierenden Verlust ihrer Lebensfähigkeit kommt. Ein großes Problem hierbei ist die Eiskristallbildung beim Tieffrieren. Durch die sich bildenden Eiskristalle kommt es zum einen zu einer direkten Schädigung der Zellen durch die Kristalle und zum anderen zu einer indirekten osmotischen Schädigung, die über Konzentrationsänderungen der in- und außerhalb der Zellen gelösten Stoffe stattfindet. Friert man Zellen langsam ein, so kommt es vor allem zur Eiskristallbildung außerhalb der

Zellen. Da nur reines Wasser in kristalline Form übergeht, bleiben die gelösten Teilchen wie z.B. Salze übrig und erhöhen die extrazelluläre Konzentration und den osmotischen Stress. Folglich kommt es zum Wasserausstrom aus den Zellen, was wiederum zu einer Konzentrationserhöhung an gelösten Stoffen innerhalb der Zellen führt. Auf diese Weise kommt es beim langsamen Einfrieren vor allem zu einer osmotischen Schädigung der Zellen. Friert man Zellen nun schnell tief, dann bilden sich ebenfalls außerhalb der Zellen Eiskristalle und die Konzentration erhöht sich wiederum extrazellulär. Jedoch bleibt diesmal nicht genug Zeit, dass Wasser entlang des entstehenden Konzentrationsgefälles aus den Zellen strömen kann und es kommt zur intrazellulären Kristallbildung, was für die Zellen letal ist. Um diesen Problemen zu entgehen, sind zwei Dinge wichtig. Zum einen sollten die Zellen langsam eingefroren werden, um die letale intrazelluläre Eiskristallbildung zu verhindern. Zum anderen werden Frostschutzmittel eingesetzt, um der Bildung von Eiskristallen entgegenzuwirken. Das von uns verwendete DMSO penetriert unter anderem in die Zellen und reduziert bis verhindert in Abhängigkeit von der Kühlrate sowohl die intra- als auch die extrazelluläre Eiskristallbildung und somit auch deren direkte und indirekte Folgen (Mazur and Schmidt, 1968; Pegg, 2002). Das konkrete Vorgehen war nun folgendes:

Entweder wurden die angezüchteten Zellen zur späteren RNA-Isolierung verwendet oder für eine spätere Weiterzüchtung in flüssigem Stickstoff konserviert. Sollten die Zellen zur RNA-Isolierung verwendet werden, wurden sie bis zu einer unter dem Mikroskop geschätzten Konfluenz von über 90 % kultiviert. Dann wurde ein Tag vor der geplanten Ernte das Kulturmedium nochmals gewechselt, um den Zellen eine optimale Versorgung zu gewährleisten. Am nächsten Tag wurde das Kulturmedium unter der Werkbank abgesaugt und die Zellen bis zur weiteren Verwendung in ihrer Kulturflasche bei -80 °C gelagert. Die zur RNA-Isolierung verwendeten Jar-Zellen wurden nach insgesamt 12 Tagen Kultivierung und zweimaligem Passagieren eingefroren. Die Linie Jeg3 nach 24 Tagen Kultur und einmaligem Passagieren. Bewo nach 35 Tagen und dreimaligem Passagieren und die Zelllinie Ach3p schließlich nach 30 Tagen Zellkultur und einmaliger Passage. Alle Zellen wurden zuvor auf Mykoplasmenfreiheit getestet. Für eine evtl. Weiterzüchtung zu einem späteren Zeitpunkt wurden auch Zellen in Kryoröhrchen bei -196 °C in flüssigem Stickstoff eingefroren. Hierzu wurde ähnlich wie beim Splitten vorgegangen. Folglich wurde das alte Kulturmedium abgesaugt, die Zellen wurden gewaschen, mit Accutase behandelt, zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und erst ab diesem Schritt unterschied sich das Vorgehen. Nun wurden die Zellen unter der Werkbank

mit 1 ml 37 °C warmen Kulturmedium je nach Zelllinie resuspendiert und dann in die Kryoröhrchen pipettiert. Anschließend wurde 10 % (100 µl) DMSO als Frostschutz unter vorsichtigem Auf- und Abschwemmen hinzugefügt. Zum Schluss wurden die Kryoröhrchen dann über Nacht in einem Styroporbehälter bei -80 °C gelagert, um am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff gebracht zu werden.

Mykoplasmentestung:

Neben der Kontamination mit Viren, Pilzen und „klassischen“ Bakterien, spielen in der Zellkultur vor allem Mykoplasmen eine wichtige Rolle. Mykoplasmen sind die kleinsten derzeit bekannten Bakterien (ca. 0,3-0,8 µm). Da sie keine für Bakterien typische Zellwand aus Peptidoglykanen besitzen, können sie eine Vielzahl von Formen annehmen. Relativ häufig kann man fadenförmige Erscheinungen finden, die an Pilze erinnern, was ihnen auch ihren Namen (griech. Mykos = Pilz) einbrachte (Hof and Dörries, 2004). Aufgrund ihrer Größe und Flexibilität können sie die zur Sterilfiltration gebräuchlichen Bakterienfilter überwinden und werden erst von Filtergrößen kleiner 0,1 µm zurückgehalten (Lindl, 2002). Nicht nur ihre äußere Erscheinung ist sehr klein, sondern auch ihr Genom, weshalb sie bestimmte lebenswichtige Bausteine nicht selbst synthetisieren können und auf Wirtszellen angewiesen sind. An diese heften sie sich über spezielle Rezeptoren an und liegen dann oft von Membranausstülpungen umgeben an der Zelloberfläche. Auch intrazelluläre Formen sind beschrieben. Diese entkommen Eradikationsversuchen besonders effektiv.

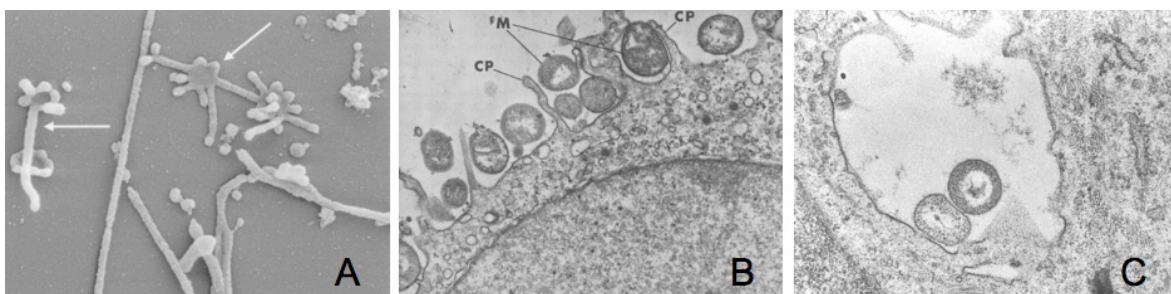


Abbildung 3.3 Elektronenmikroskopische Mykoplasmenaufnahmen

(A) Mykoplasmen auf Glasobjektträger (Drexler and Uphoff, 2002). (B) Extrazellulär von Membranausstülpungen umgeben liegende Mykoplasmen (Stanbridge, 1971). (C) Intrazellulär in einer Vakuole liegende Mykoplasmen (Stanbridge, 1971).

Nachdem Mykoplasmen zum Überleben auf Wirtszellen angewiesen sind, schädigen sie diese nicht so dramatisch wie Erreger, die wirtsunabhängig überleben können. Dennoch haben sie für die Zellkultur verheerende Folgen, da sie relativ schnell über eine Vielzahl

von Wegen in die Zellkultur gelangen. Einmal dort angelangt, bleiben sie lange Zeit unentdeckt und können die Zellen sowohl strukturell als auch funktionell schädigen. Hinzu kommt noch, dass sie nur schwer zu eradizieren sind. In seltenen Fällen, bei Isolation infizierter Zellen, kommen Mykoplasmen bereits in einer Primärkultur vor. Weiters können sie über die verwendeten Seren in die Kultur eingebracht werden, was das Vorkommen von tierartspezifischen Formen erklärt. Zumeist werden sie jedoch vom Menschen, der vor allem im Oropharynx Mykoplasmen beherbergt, über Schmierinfektion oder Aerosolbildung übertragen. Aerosole entstehen auch in den Zellkulturbehältnissen und können beim Medienwechsel oder Splitten einen Infektionsweg darstellen. Getrocknet sind Mykoplasmen auch außerhalb der Kulturbehältnisse sehr widerstandsfähig, so dass es durch ungenügende Desinfektion der verwendeten Gegenstände zur Infektion kommen kann (Drexler and Uphoff, 2002; Stanbridge, 1971). Selbst ein Überleben in der flüssigen Phase von -196 °C kaltem Stickstoff ist beschrieben. Hier sollen die Mykoplasmen in die Kryoröhrchen eindringen und so zur Kontamination führen können (Helgason and Miller, 2004). Sind die Zellen einmal befallen, kann dies lange Zeit nicht auffallen, da sich Mykoplasmen nur langsam vermehren und ihr Wachstum durch die oft eingesetzten Antibiotika Penicillin/Streptomycin verlangsamt und maskiert, jedoch nicht aufgehalten wird. Erstes Anzeichen kann dann ein verlangsamtes Wachstum sein. Dies lässt sich z.B. durch die Konkurrenz um Amino- und Nukleinsäuren erklären. Vor allem die während des Wachstums bedingt essentielle Aminosäure Arginin ist hier zu erwähnen. Denn einige Mykoplasmenarten verbrauchen zur Energiegewinnung Arginin anstatt Zucker (sog. Nonfermenter). Morphologisch können vermehrte Zytoplasmaabschnürungen, pyknotische oder „leopardenmusterartige“ Zellkerne, Zellysen (zytopathische Effekte) oder aber gar keine morphologisch Veränderungen vorkommen. Dennoch finden auch im letzten Fall strukturelle und funktionelle Alterationen statt. Infizierte Zellen zeigen vor allem einen veränderten Amino- und Nukleinsäurenstoffwechsel, der sich nicht zuletzt hinsichtlich der Anzahl und der Struktur der DNA und Chromosomen zeigt. Auch können die Genexpression und die Zelloberfläche verändert sein. Aus den hier aufgezählten Effekten, die bei Weitem nicht vollständig die Folgen von Mykoplasmeninfektionen beschreiben, ist ersichtlich, dass eine Infektion mit Mykoplasmen sich höchstwahrscheinlich auf die Ergebnisse auswirkt, die mit infizierten Kulturen erzielt werden. Aus diesem Grund ist es empfehlenswert, kontaminierte Kulturen entweder zu verwerfen oder eine gezielte Eradikation durchzuführen. Da es eine Vielzahl von verschiedenen Mykoplasmenarten gibt und Mykoplasmen sich auch intrazellulär geschützt aufhalten können, ist eine Eradikation

jedoch nicht immer einfach, zumal die eingesetzten Präparate auch durch ihre Toxizität nur beschränkt einsetzbar sind. Aus diesem Grund ist ein Verwerfen der Zellen oft der einfachere Weg (Drexler and Uphoff, 2002; Stanbridge, 1971). Um der Gefahr zu entkommen, unentdeckt infizierte Zellen zu verwenden, gibt es eine Reihe von Testmöglichkeiten auf Mykoplasmen. Wir verwendeten den Lumineszenztest MycoAlert Mycoplasma Detection Kit der Firma Lonza. Dieser Test macht sich die enzymatische Ausstattung der Mykoplasmen zu Nutze. In einem ersten Schritt werden die Mykoplasmen durch ein „reagent“ lysiert, damit ihre Enzyme freierwerden. Anschließend wird eine Lumineszenzmessung durchgeführt. In einem zweiten Schritt wird nun ein Substrat hinzugegeben, welches durch die freigewordenen Mykoplasmenenzyme umgesetzt wird, wobei ATP entsteht. Dieses ATP ist nun für eine zweite Reaktion wichtig. Das im „reagent“ enthaltene Luciferin wird mit Hilfe des ATP (proportional zu dessen Menge) in Oxyluciferin und Licht umgewandelt. Nun wird nochmals eine Lumineszenzmessung durchgeführt und ein Quotient aus beiden Messergebnissen gebildet, der bei einem Wert über 1 für eine Kontamination der Zellen mit Mykoplasmen spricht. Das Vorgehen war laut Lonza-Protokoll folgendes:

Unter der Sterilwerkbank wurden zuerst je 600 µl Puffer aus dem Kit zu den beiden Röhrchen mit dem lyophilisierten „reagent“ und Substrat hinzugefügt und unter mehrmaligem Kippen vermischt. Anschließend wurden beide Röhrchen für 15 min bei Raumtemperatur stengelassen, damit sich alle Substanzen lösen und Raumtemperatur erreichen können, die für die Luciferasereaktion das Temperaturoptimum darstellt. In der Zwischenzeit wurden 2 ml Überstand von jeder Zellkulturflasche entnommen, in ein Eppendorfröhrchen überführt und für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Hierauf wurden aus jedem Röhrchen je 100 µl klarer Überstand entnommen und in je ein Feld einer lumineszenzgeeigneten 96 „well“ Mikrotiterplatte pipettiert. Zu jedem der vier Felder, das den Überstand einer Zelllinie enthielt, wurden 100 µl „reagent“ pipettiert und die Mikrotiterplatte für 5 min stengelassen. Dann erfolgte die erste Lumineszenzmessung mit einer Lesezeit von 1 sek. Nach der ersten Messung wurden zu jedem der vier Felder 100 µl Substrat hinzugefügt und die Mikrotiterplatte für 10 min stengelassen. Nach dieser Zeit erfolgte schließlich die zweite Messung. Zum Schluss wurde der Quotient aus Messung 2 durch Messung 1 errechnet. Er lag für die Zelllinie Jar bei 0,285, für Jeg3 bei 0,442, für Bewo bei 0,353 und für Ach3p bei 0,368 (9).

Zellanzucht Immunfluoreszenzfärbung:

Nach Auswertung der PCR-Ergebnisse wurden gegen Ende der Arbeit Immunfluoreszenzfärbungen mit der Zelllinie Ach3p durchgeführt. Aus diesem Grund wurde ein Kryoröhrchen der zuvor in flüssigem Stickstoff tiefgefrorenen Ach3p-Zellen nach den beschriebenen Schemata aufgetaut und in Kultur gebracht. In ihrer zweiten Passage wurden die Zellen vom Kulturgefäß enzymatisch abgelöst, zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen in 3 ml 37 °C warmen Kulturmedium resuspendiert. Hiervon wurden 2 ml Zellsuspension zur Weiterzucht auf 2 neue Kulturflaschen verteilt, während 1 ml in ein 15 ml Röhrchen pipettiert wurde, in dem sich bereits 9 ml Kulturmedium für die Linie Ach3p befanden. Nach dreimaligem vorsichtigen Auf- und Abschwemmen wurden dann je 100 µl Röhrcheninhalt mittig auf die Enden von 40 zuvor autoklavierten Glasobjektträgern pipettiert, sodass sich auf jedem Objektträger 200 µl Zellsuspension befanden. Die Objektträger lagen in quadriPerm-Kulturgefäßen, die zuvor mit 75 % Alkohol desinfiziert und für 15 min mit UV-Licht unter der Sterilwerkbank bestrahlt wurden. Nachdem alle Objektträger mit Zellen versehen waren, wurden sie in den bedeckelten quadriPerm-Gefäßen für 2 Stunden inkubiert, damit sich die Zellen setzen konnten. Hierauf wurden vorsichtig 2 ml Kulturmedium in jede Kammer pipettiert, damit die Zellen nicht austrockneten und genug Nährstoffe hatten. Anschließend wurden die Zellen über Nacht wieder inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen vor allem hinsichtlich Wachstum und Kontamination unter dem Mikroskop kontrolliert. Aufgrund einer zu geringen Dichte trotz guter Proliferation der verstreuten Einzelzellen wurden die Zellen, nach Hinzufügen von nochmals 2 ml Kulturmedium in jede Kammer, ein zweites Mal über Nacht inkubiert. Am dritten Tag wurden die Zellen dann bei einer stellenweise ausreichenden Dichte in HBSS-Puffer gewaschen, indem sie einmal vorsichtig in ein mit Puffer gefülltes Glasgefäß getaucht wurden. Zuletzt wurden sie für 1 Stunde luftgetrocknet und anschließend bei -20 °C gelagert.

3.2 RNA-Isolierung

Nach Anzucht der Zellen wurde als nächstes die RNA aus den zuvor bei – 80 °C gelagerten Zelllinien Jar, Jeg3, Bewo und Ach3p isoliert. Um Kontaminationen, vor allem mit Ribonukleasen, zu vermeiden, wurden stets saubere Laborkleidung und Handschuhe getragen. Nach dem Anziehen der Handschuhe wurde darauf geachtet, dass nur die nötigsten Gegenstände berührt wurden. Außerdem wurden alle Arbeitsflächen und

verwendeten Geräte vor dem Gebrauch gereinigt und mit 75 % Alkohol desinfiziert. Die verwendeten Pipettenspitzen und Eppendorfgefäße wurden vor ihrer Verwendung autoklaviert.

3.2.1 Geräte, Gebrauchsmaterial, Chemikalien, Lösungen

Tabelle 3-5 Geräte RNA-Isolierung

Gerätemodell	Hersteller
ChemiDoc XRS System	Bio-Rad Laboratories
Elektrophoresekammer HE33	Hoefer Inc
Kühlschrank +4 und -20 °C	Liebherr
Pipetten Pipetman P10, P20, P200, P1000	Gilson
Mikrowelle	Schaub Lorenz
Mikrozentrifuge 1-13	Sigma
Minishaker MS 1	Ika
Sicherheitswerkbank mit Abzug	?
Spannungsgerät Power Supply EPS 600	Pharmacia Biotech
Spektralphotometer NanoDrop ND-1000	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Thermomixer Comfort (1,5 ml)	Eppendorf
Waage SBC 21	Scaltec Instruments
Kühlzentrifuge 3K 15	Sigma

Tabelle 3-6 Gebrauchsmaterial RNA-Isolierung

Gebrauchsmaterial	Hersteller (Katalognummer)
Eppendorfgefäß 3810X 1,5 ml	Eppendorf AG (0030125150)
Doppelspatel	?
Glaskolben 250 ml	?
Glasmesszylinder 50 ml	?
Pipettenspitzen 20 µl	Carl Roth GmbH (AL17.1)
200 µl	Carl Roth GmbH (B007.1)
1000 µl	Greiner Bio-One GmbH (686271)
Röhrchen konisch 50 ml	Falcon (352098)
Ständer für Reaktionsgefäße	neoLab (2-1969)

Tabelle 3-7 Chemikalien und Lösungen RNA-Isolierung

Chemikalie, Lösung	Hersteller (Katalognummer)
Bromchlorpropan (BCP)	Molecular Research Center (BP151)
DNA Standard 100 bp	Invitrogen (15628019)
EDTA UltraPure 0,5 M pH 8,0	Invitrogen (15575020)
Ethanol absolut	Merck (1.00983.1000)
Ethidiumbromid	Invitrogen (15585011)
Isopropanol	Otto Fischer GmbH (606003000)
Ladepuffer 6x	Fermentas (R0611)
LE Agarose	Biozym Scientific GmbH (840004)
TAE-Puffer 1x	?
TRI Reagent	Molecular Research Center (TR118)
Tris-Pufferan	Carl Roth GmbH (5429.3)
Wasser DEPC-behandelt	Carl Roth GmbH (T143.3)
Selbsthergestellte Lösung	Zusammensetzung
TE-Puffer	9,88 ml aqua bidestillatum +100 µl Tris-HCl 1M pH 8,0 + 20 µl EDTA 0,5 M pH 8,0
100 bp Standard (50 µg/ml)	750 µl TE-Puffer +200 µl Ladepuffer 6x + 50 µl Standard 100 bp (1 µg/µl)

3.2.2 Isolierung, Konzentrationsbestimmung, Qualitätskontrolle

RNA-Isolierung:

Die Isolierung von RNA aus Zellen besteht im Allgemeinen aus zwei Schritten. Zuerst müssen die Zellen lysiert werden, damit ihr Inhalt freigesetzt wird. Ist dies erfolgt, muss die RNA aus dem „Zellinhaltscocktail“ separiert werden. Erschwert wird dieser Prozess durch RNA abbauende Enzyme, sog. Ribonukleasen. Da diese im Nucleinsäurenstoffwechsel eine entscheidende Rolle spielen, kommen sie in jeder lebenden Zelle vor und sind somit fast ubiquitär. Vor allem über Bakterien und Pilze führen sie bei der Arbeit im Labor zur Probenkontamination. Jedoch spielen sie auch in der Verdauung und bei der Erregerabwehr eine Rolle und werden deshalb auch über Körperflüssigkeiten ausgeschieden (Schweiß, Speichel, Tränen...). Ribonukleasen sind

sehr beständige Enzyme, die eine Zahl von Denaturierungsprozessen überstehen können und deshalb nicht einfach zu eliminieren sind (10). Zur RNA-Isolierung verwendeten wir die „single-step“ Methode mit TRI-Reagent der Firma Molecular Research Center gemäß beiliegendem Protokoll (11). TRI-Reagent beinhaltet Guanidinthiocyanat und Phenol, beides giftige Stoffe, weshalb unter einer Werkbank mit Abzug gearbeitet wurde. Das Prinzip dieser Methode ist folgendes: Guanidinthiocyanat, ein stark chaotropes (grie. chaos = Unordnung, tropos = Art) denaturierendes Reagenz, lysiert die Zellen und inhibiert gleichzeitig die Ribonukleasen (12). Phenol, das schwerer als Wasser ist und ebenfalls Proteine denaturiert, dient diesen und der DNA als organisches Lösungsmittel. Wichtig ist hierbei der pH des Phenols, der bei Sättigung mit Wasser sauer ist. Nur bei saurem pH löst sich die DNA in Phenol und kann so von der wasserlöslichen RNA separiert werden (13) (Kirby, 1956). Nach Hinzugabe von Bromchlorpropan wird nun durch Zentrifugation eine Phasentrennung erreicht. Bromchlorpropan stellt ebenfalls ein organisches Lösungsmittel, das schwerer als Wasser ist, dar. Es bewirkt eine deutlichere Phasentrennung und reduziert im Vergleich zum klassischerweise verwendeten Chloroform die Kontamination der wässrigen Phase mit DNA (14). Durch die Zentrifugation entsteht oben eine klare wässrige Phase mit gelöster Gesamt-RNA, gefolgt von einer weißlichen Interphase mit nichtlöslichen Proteinen und DNA. Unten verbleibt eine rötliche organische Phase, die ebenfalls Proteine und DNA enthält. Nach der Phasentrennung wird nun die wässrige Phase abpipettiert und anschließend die RNA mittels Propanol oder Ethanol ausgefällt (Chomczynski and Sacchi, 1987). Um noch vorhandene Salze zu entfernen, die die Degradierung von RNA katalysieren und bei Lagerung somit schädigend wirken können, wird noch ein Waschschriff mit Ethanol angeschlossen. Danach wird das ausgefällte RNA-Pellet wieder gelöst. Hier sollten entweder destilliertes Wasser oder spezielle RNA-Lösungsmittel verwendet werden. Destilliertes Wasser enthält keine divalenten Ionen (z.B. Magnesium) mehr, die den Abbau von RNA katalysieren könnten. Es sollte zur Deaktivierung evtl. vorhandener Ribonukleasen mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt werden. Auch kann man zur Komplexierung evtl. noch vorkommender Ionen EDTA zusetzen (11) (Pinto et al., 2009). Das konkrete Vorgehen bei der RNA-Isolierung war nun wie folgt:

Nachdem die Zellen aus dem -80 °C Tiefkühlschrank entnommen waren, wurden sie rasch unter die Werkbank gebracht und 2 ml TRI-Reagent pro Kulturflasche hinzugefügt. Lediglich bei der Zelllinie Jar wurde nur 1 ml verwendet. Um eine gute Zelllyse und Ribonukleaseninaktivierung zu erreichen, wurde die Kulturflasche für ca. 5 min auf einem

Minishaker gevortext und zwischenzeitlich geschwenkt. Anschließend wurde der Flascheninhalt noch ein paar Mal mittels Pipette auf- und abgeschwemmt, je 1 ml in ein Eppendorfgefäß überführt und für 5 min zum Einwirken bei Raumtemperatur stehengelassen. Dann wurden je 100 µl Bromchlorpropan hinzugefügt, die Eppendorfgefäße 20x hin und her gekippt und für 10 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Hierauf wurde für 15 min bei 12000 g und 4 °C zentrifugiert. Laut Hersteller reduziert hier eine Zentrifugation bei niedrigen Temperaturen die DNA-Kontamination der wässrigen Phase. Nach der Zentrifugation wurde der klare Überstand jeweils in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die RNA mittels Hinzugabe von 500 µl Isopropanol, 20x Kippen und Inkubation bei Raumtemperatur ausgefällt. Anschließend wurde für 8 min bei 12000 g und 4 °C zentrifugiert. Dann wurde der Überstand, der sich über dem weißlichen am Boden anhaftenden RNA-Pellet gebildet hatte, vorsichtig dekantiert und das Pellet mit je 1 ml 75 % Ethanol unter mehrmaligen Kippbewegungen gewaschen, bis sich das Pellet vom Boden des Eppendorfgefäßes abgelöst hatte und von allen Seiten mit Ethanol umspült worden war. Hierauf wurde für 5 min bei 7500 g und 4 °C zentrifugiert. Dann wurde der Überstand wieder dekantiert, die Eppendorfgefäße nochmals kurz abzentrifugiert, um verbliebene Ethanolreste vorsichtig abpipettieren zu können und das Pellet anschließend für 3-5 min luftgetrocknet. Um eine ausreichende Resuspension des Pellet zu erreichen, darf es laut Hersteller jedoch nicht austrocknen. Nach Resuspension in je 100 µl mit DEPC behandeltem bidestilliertem Wasser wurden die Eppendorfgefäße noch für 15 min in einem Thermomixer bei 55 °C inkubiert. Zum Schluss wurden sie bis zur anschließenden Vermessung am Nanodrop auf Eis gestellt.

RNA-Konzentrationsbestimmung am NanoDrop:

Zur Bestimmung der Konzentration der isolierten RNA und deren Reinheit wurde das Spektralphotometer NanoDrop ND-1000 der Firma PEQLAB verwendet.

Die Messungen basieren auf dem Prinzip der Absorptions-Spektralanalyse. Es wird die Absorption von kurzwelligem Licht durch die eingesetzten Lösungen gemessen und mittels Lambert-Beerschem Gesetz deren Konzentration errechnet. Außerdem kann durch die Bildung des Quotienten der Absorption bei 260 nm durch 280 nm auf die Reinheit der RNA geschlossen werden. Werte um 2 sprechen hierbei für relativ reine RNA, viel kleinere Werte für eine Verunreinigung mit Phenol oder Proteinen (15). Die Messungen erfolgten folgendermaßen:

Zuerst wurden 2 µl des zur Lösung der RNA verwendeten Wassers zum Eichen als Nullwert vermessen. Nach Entfernen des Wassers wurden dann jeweils 3 Messungen mit je 2 µl RNA durchgeführt. Zwischen den einzelnen RNA Messungen wurde das Gerät jedesmal mit Wasser gereinigt. Die RNA-Proben wurden vor jeder Messung kurz gevortext, um eine gleichmäßige Durchmischung zu erreichen. Nach der Messung wurden alle vier Proben mit bidestilliertem DEPC behandeltem Wasser auf 100 ng/µl verdünnt und jede Probe nochmals zweimal vermessen. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -20 °C gelagert.

RNA-Qualitätskontrolle mittels Agarose-Gelelektrophorese:

Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden Teilchen aufgrund ihrer Ladung, Größe und Form durch eine angelegte Spannung getrennt. Im Falle von RNA macht man sich die negative Ladung der Phosphatgruppen und die unterschiedlichen Größen der einzelnen RNA-Moleküle, die in der isolierten Gesamt-RNA vorkommen, zu Nutze. Dabei pipettiert man die RNA in Kammern eines Gels, welches in einer Wanne mit Puffer liegt. Das Agarose-Gel weist hierbei eine dreidimensionale schwammartige Gitterstruktur auf, deren Poren mit zunehmender Agarosekonzentration kleiner werden. Nach Anlegen einer Spannung an das Gel wandern die negativ geladenen RNA-Moleküle nun zur Anode, wobei sie je nach Größe und Form unterschiedlich stark von den Poren daran gehindert werden, wodurch ihre Auftrennung entlang der Wanderstrecke erfolgt. Ist die RNA in einem guten nicht degradierten Zustand, entstehen scharfe ribosomale 18S und 28S Banden, die mittels Fluoreszenzfarbstoffen sichtbar gemacht werden können. Die 28S Bande sollte im Vergleich zur 18S Bande von annähernd doppelter Intensität sein. Als Fluoreszenzfarbstoff findet Ethidiumbromid häufig Anwendung. Ethidiumbromid ist eine kanzerogene Chemikalie, die sich zwischen Nukleinsäurestränge schiebt (sog. Interkalation) und sich dort somit konzentriert. Da sich komplementäre RNA-Abschnitte ebenfalls mittels Wasserstoffbrückenbindungen zusammenlagern können (sog. Sekundärstruktur), ist auch eine Anfärbung von RNA mit Ethidiumbromid möglich. Hinzugefügt sei noch, dass es während der Elektrophorese zur Elektrolyse von Wasser an den Elektroden kommt, woraus Veränderungen des pH's resultieren. Aus diesem Grund werden Puffer wie etwa TAE verwendet. Neben der pH-Stabilisierung verhindert er auch durch EDTA eine Degradierung der RNA, da EDTA den für manche Ribonukleasen wichtigen Cofaktor Magnesium komplexiert. Das konkrete Vorgehen war nun folgendes:

Zuerst wurde eine 1 % Agarose-Gels (50 ml TAE 1x + 0,5 g Agarose) mit 1 µl Ethidiumbromid hergestellt. Dann wurden die Kammern des in einer wässrigen Pufferlösung liegenden Gels mit einem Gemisch aus 5µl RNA (100 ng/µl) + 5 µl mit DEPC behandeltem bidestilliertem Wasser + 2 µl Ladebuffer 6x befüllt. Der Ladebuffer bewirkt zum einen eine Erhöhung der Dichte (z.B. durch Glycerol), damit die RNA-Lösung in die Gelkammern sinken kann, zum anderen enthält er Farbstoffe, damit man das Einfüllen und die Wanderung der RNA optisch verfolgen kann. Zum Schluss wurden die Proben für 20 min bei 80 Volt aufgetrennt und anschließend mit dem Transluminometer ChemiDoc XRS von Bio-Rad fotodokumentiert (Greene and Rao, 1998).

3.3 RT-PCR

Nach Isolierung der RNA wurden die 4 Zelllinien mittels RT-PCR auf die Expression der zu untersuchenden ADAMs, ADAMTSs und ADAMTSLs durchgescreent. Hierbei wurden nicht nur die Hygienestandards der RNA-Isolierung beachtet, sondern es wurden auch sterile Filterspitzen verwendet, die bei jedem neuen Pipettierschritt gewechselt wurden.

3.3.1 Geräte, Gebrauchsmaterial, Chemikalien, Lösungen, Kits

Tabelle 3-8 Geräte RT-PCR

Gerätemodell	Hersteller
ChemiDoc XRS System	Bio-Rad Laboratories
Elektrophoresekammer HE99	Hoefer Inc
Kühlschrank +4 und -20 °C	Liebherr
Pipetten Pipetman P10, P20, P200	Gilson
Mikrowelle	Schaub Lorenz
Minishaker MS 1	Ika
Minizentrifuge Rotalibo „Uni-fuge“	Carl Roth GmbH
Spannungsgerät Power Supply EPS 600	Pharmacia Biotech
Thermal Cycler C1000	Bio-Rad Laboratories
Waage SBC 21	Scaltec Instruments

Tabelle 3-9 Gebrauchsmaterial RT-PCR

Gebrauchsmaterial	Hersteller (Katalognummer)
Doppelspatel	?
Glaskolben 500 ml	?
Glasmesszylinder 150 ml	?
Hard-Shell 96 „well“-Platte	Biozym Scientific GmbH (621621)
PCR-Softstrips 0,2 ml gem. Farben	Biozym Scientific GmbH (71088)
Pipettenfilterspitzen steril 10 µl	Sorenson BioScience Inc. (10320)
200 µl	Sorenson BioScience Inc. (10350)

Tabelle 3-10 Chemikalien, Lösungen und Kits RT-PCR

Chemikalie, Lösung	Hersteller (Katalognummer)
DNA Standard 100 bp	Invitrogen (15628019)
Ethidiumbromid	Invitrogen (15585011)
Ladepuffer 6x	Fermentas (R0611)
LE Agarose	Biozym Scientific GmbH (840004)
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen (210212)
TAE-Puffer 1x	?

3.3.2 RT-PCR, Gelelektrophorese, Fotodokumentation

Durchführung RT-PCR:

Nach der RNA-Isolierung lag das Hauptaugenmerk dieser Arbeit auf der Expressionsanalyse der derzeit beim Menschen bekannten ADAMs, ADAMTSs und ADAMTSLs. Die Grundüberlegung bei der Untersuchung der Genexpression ist, dass Gene (genomische DNA) in messenger RNAs (mRNAs) umgeschrieben werden und diese letztendlich als Bauanleitung zur Proteinherstellung dienen (sog. Expression). Wie aktiv ein Gen nun exprimiert wird, lässt sich anhand der mRNA-Menge abschätzen. Für diese Aufgabenstellung ist die Analyse mittels semiquantitativer RT-PCR ein gängiges Mittel. Dieses Verfahren ist eine Kombination aus Reverser Transkription und anschließender Vervielfältigung mittels PCR. Führt man danach eine Gelelektrophorese durch, kann man anhand des Fluoreszenzsignals Rückschlüsse auf die Expression und deren evtl. unterschiedliche Ausprägung ziehen, nicht jedoch auf absolute Konzentrationen (semiquantitativ). Voraussetzung hierfür ist der Einsatz gleicher Gesamt-RNA-Mengen,

Pipettiergenauigkeit, gleiche RT-PCR-Effizienzen und ein Stoppen der PCR noch während der exponentiellen Phase. Wir entschieden uns, das OneStep RT-PCR Kit von Qiagen zu verwenden, das die Durchführung von Reverser Transkription und PCR in quasi einem Schritt ermöglicht. Voraussetzung für eine effiziente Nutzung dieses Kits ist die Kenntnis der Basensequenzen der zu untersuchenden mRNA und die Verwendung von spezifischen Primern. Die Primer lagen für die Arbeit bereits vor. Sie wurden mit Hilfe ihrer NM_-Nummer in der NCBI RefSeq-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/key.html>) und des Programms Primer3 v 0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>) erstellt. Bei ihrem Design wurden die Grundeinstellungen des Programms genutzt. Es wurde darauf geachtet, dass alle Primerpaare dieselbe Schmelztemperatur von Tm 60 °C besaßen. Da alle verwendeten Primer entweder ein Intron überspannten oder flankierten, war es möglich, Amplifikate von noch evtl. vorhandener DNA in der Gelelektrophorese anhand ihrer größeren Länge von den gesuchten RNA-Amplifikaten zu unterscheiden. Verschieden designte Primer für ein und dasselbe Gen wurden mit a, b und c durchnummeriert.

Tabelle 3-11 Verwendete Primersequenzen ADAMs

RefSeq	Primer	Exon	vorwrts	Exon	rckwrts	Produktgröße	Genomgröße
NM_001464	ADAM 2a	10	TGCAAACATATGCAGGAGGTG	12	GCTTCCAGCTTTGCATTACC	318 bp	17579 bp
	ADAM 2b	6	TTATGGAATAGAACCCTGGGA	11	CTGGATTATAATGCAGACAGC	650 bp	44112 bp
NM_003817	ADAM 7a	11	CCTTCAGGAAAATGCGTGAT	14	TTCCCATGAAACAGTAGCC	452 bp	4772 bp
NM_001109	ADAM 8a	3	TTC CGG CTA CAC AGA GAC CT	6	GAACTCTGCATTGTCCACGA	400 bp	1064 bp
	ADAM 8b	21	ACCCTTCCCAGTTCCTGTCT	23	CTTCTGCGCAACTTCTC	247 bp	4287 bp
	ADAM 8c	17	AAGGACGTTGCCAGGACTTA	19	AGAACCACCACCACGAAGAC	190 bp	1139 bp
NM_003816	ADAM 9a	11	TGAATCACGATGATGGGAGA	12	CCAGCGTCCACCAACTTATT	211 bp	15346 bp
	ADAM 9b	17	TCCAGTGTGTAGATGCTTCTGTT	19	CTCCACAGTTGATCCCTCTTG	174 bp /280 bp	7499 bp
NM_001110	ADAM 10a	10	AGCAACATCTGGGGACAAC	11	CCAGGTTTCAGTTTGCAAT	241 bp	6319 bp
	ADAM 10b	2	ATGAAGGATTATCTTACAATGTGGA	3	AAAGGGAAGTGTCCCTCTTCA	150 bp	35412 bp
	ADAM 10c	2	ACCAGCGTGCCAAAAGAG	5	CCAGTCATCTGGTATTTCTTCA	152 bp	52531 bp
NM_002390	ADAM 11a	11	AGATCCAGGTGCAGGATGAC	14	TGCTGGACACTTGCAGTCC	297 bp	1391 bp
NM_003474	ADAM 12a	5	TCAGCACGTGTTCTGGTCTC	9	ACACTTCCACGCCTACCAAC	396 bp	34413 bp
	ADAM 15a	2	AGCCTCAAAAAGGTGCTTCA	5	TCTTCCCTGGTAGCAGCAGT	201 bp	1417 bp
NM_207197/6	ADAM 15b	18	TCCTCAGCCTCCTGGTCTTA	20	CAGGCAGTGGCTTCCTTG	158 bp	2059 bp
	ADAM 17a	17	TTGGGTCTGTCTGGTTTTTC	19	CCATTCTCTGGTGGTCCAGT	261 bp	2589 bp
ADAM 17b	ADAM 17b	12	GTGTTTTCAAGAACGCAGCA	13	ACGCCTTTGCAAGTAGCATT	231 bp	3120 bp
	ADAM 18a	15	GTGCTCCATTGCTGTTTTT	16	CATCAGCCACATAGGCATTG	264 bp	2764 bp
ADAM 18b	ADAM 18b	16	CAATGCCTATGTGGCTGATG	18	ATGTCCAGGGAAGCATTGAC	166 bp	26648 bp
	ADAM 19a	1	CTC TGC TTG CTG GCG TTT	5/6	TCCTCTAATTCCTCGGCAAG	387 bp	44867 bp
ADAM 19b	ADAM 19b	5	GACAGAAGTGTCCAGCGTCA	6	TCGCTTCTGGTCTGTTGTG	229 bp	11004 bp
	ADAM 20a	1	AACAGGTTGGTCTTTTTTGC	1	CACATTCTCCCTTCTTCA	274 bp	274 bp
NM_003813	ADAM 21a	1	AACAGGTTGGTCTTTTTTGC	1	ATAGCCTCTGTGCTGGCAGT	238 bp	238 bp
	ADAM 21b		CACCTGCTGGGGTATTGACT		AGGTCTCAGGAAGGCAGACA	152 bp	152 bp
NM_021723	ADAM 22a	29	GTAACCTGGGAGGCAACAAA	31	TGTGAAACTCCGTTCCCTCT	362 bp	14684 bp
	ADAM 22b	3	GCCTTTGGAACGTCATTCAT	64	TGTGTGGTTCCCGTCATAGA	219 bp	136240 bp
	ADAM 22c	25	TTGCTGGCACCATTTTAGTG	28	CGCCCATTTTACAGATGTC	154 bp	13413 bp
NM_003812	ADAM 23a	5	GAGGCGTCAAAGACTCCAAG	10	CAAGGTTGACCACGGACTTT	390 bp	15405 bp
NM_014265	ADAM 28a	9	ATGGAGGGGGAGTGTCTCT	11/12	GCTCAGTGCTTTGTCCATCA	271 bp	6170 bp
NM_014269	ADAM 29a	5	TCCAGAGTGGTGAATGGTA	5	TGACCAACACGGTACACATA	207 bp	207 bp
NM_021794	ADAM 30a	1	TGAGCTGGGTCTATGCTGTAG	1	GATTGGCAACACCGATCTTT	273 bp	273 bp
NM_145004	ADAM 32a	12	GCAGATTGGAGGGAAATGAA	14	TCAGGACCACATTCTGGTGA	232 bp	11854 bp
	ADAM 32b	5	TCCAGATTCATGGTCACAC	6	TCCATTGGTTGTTCTTTCAGG	189 bp	1698 bp
NM_025220	ADAM 33a	16	GTTACCTAGATGGCCAGGA	18	CTGGAGCACAGTGGCAGTTA	232 bp	389 bp
	ADAM 33b	2	CACCTGGTCTGGATGGA	3	GGAGCTCCTGGCCTTCAG	106 bp	2454 bp

Tabelle 3-12 Verwendete Primersequenzen ADAMTSs und ADAMTSLs

RefSeq	Primer	Exon	vorwrts	Exon	rckwrts	Produktgröße	Genomgröße
NM_006988	ADAMTS 1a	8	CCTCTGTCTGTGTGCAAGGA	9	GTGGCTCCAGTTGGAATTGT	184 bp	344 bp
	ADAMTS 1b	2	CAGTCACCGCTATGTGGAAA	2	CCCTTCTGTTCATCGTGGAT	189 bp	189 bp
NM_014244	ADAMTS 2a	17	CGGGTCTCACTGACGTACAA	18	GAAGCCACGGTGTACCATCT	204 bp	2032 bp
	ADAMTS 2b	2	CTACGTCCAGAGCAGGGGTA	2	TCCTCCGACGTAGAGACAGCTC	247 bp	247 bp
NM_014243	ADAMTS 3a	17	GTCTTCACACCGATGGACCT	19	GCTGCGATGGACCATTITAT	272 bp	8236 bp
NM_005099	ADAMTS 4a	6	TCCTGCAACACTGAGGACTG	7	CGTGGCTCCAGCACATAGTA	209 bp	460 bp
	ADAMTS 4b	1	GAGCCCTGTTAGGCGTGTTA	2	TAGCAGGTAGCGCTTAGCC	290 bp	1404 bp
NM_007038	ADAMTS 5a	4	TGTGAAAGGGGAGAATCTG	5	CCTCTTCCTGTGCAGTAGC	207 bp	1628 bp
NM_197941	ADAMTS 6a		AACCTTGGTGGCTGAATGAC		CCTAGGCTGGAATCACGGTA	226 bp	716 bp
NM_014272	ADAMTS 7a		GGTCCGTGAGCAAAGAGAAG		CCCCTTCATGTTGATGCTTT	278 bp	5989 bp
NM_007037	ADAMTS 8a		ATGTTCTCGGACCTGTGGAG		TCCCGTCCATGTCAGGTAA	206 bp	2682 bp
NM_182920	ADAMTS 9a		CCCAGACAGTGGCTTAGCTC		CACAGGCTCTTTGCTCATCA	239 bp	5191 bp
	ADAMTS 9b	2	CGGATTTATCGCTCCACTGT	3	CATCATGAGACCGGAATGTG	191 bp	5395 bp
NM_030957	ADAMTS 10a		CCCCAGACAGGACTTTGTGT		AGACCCGTTTGTAGCACAC	236 bp	3786 bp
	ADAMTS 10b	18	AGGACAAGTGCCGAGTGTGT	19/20	GGGCCAAGTACTGAGAGAG	168 bp	2513 bp
NM_030955	ADAMTS 12a	21	CCATTTCACTGCCAGTTCC	22	TTGCAAGACATGGTGGATGT	200 bp	3204 bp
NM_139025	ADAMTS 13a	26	AGCCAACAGGAACCATTGAC	27	GCTTCCTGCACATCTTCCTC	177 bp	504 bp
	ADAMTS 13b	3	GCAGAGGCAGAGGCAGAG	4	GGCTCTGTGAGAATGACCATC	210 bp	1266 bp
NM_080722	ADAMTS 14a	2	GTCACGTGTTTTCGGGAAGGA	3	GCTCCAGAGGCTCAATGAAG	247 bp	27563 bp
NM_139055	ADAMTS 15a	1	CAACATCGTTGTGGTCAAGG	2	GGTCACACATGGTACCCACA	236 bp	11794 bp
NM_139056	ADAMTS 16a	3	GGACTTCCAGCAGCCTAGTG	4	TGAAGGAAGTGGCCTTAGGA	218 bp	35806 bp
NM_139057	ADAMTS 17a	5	TGCTCTGCTACGACAACGTC	7	CAGTGTACACGGTTCATCC	221 bp	8235 bp
NM_199355	ADAMTS 18a	3	CAGAAGCTCCCTGCACTACC	4	GGTAATGGCGAGATGAGGAA	267 bp	63838 bp
NM_133638	ADAMTS 19a	20	CCCCTTGTTACAGAACTTGT	21	GTCGATGACGTATGCCTTT	223 bp	2869 bp
NM_025003	ADAMTS 20a	10	TGGAACAAGCAGTGTGAGC	12	ACAGGACGTGTTCCGTTTC	213 bp	10646 bp
NM_139238	ADAMTSL 1a		TGTTCACTCAAGTGCCAAGC		TTACTGCCCCTCGGACCAG	224 bp	48200 bp
NM_014694	ADAMTSL 2a		TCAGAGTGACCAAGACCTG		CCGACAGAGTTCACTTTGAT	215 bp	973 bp
NM_207517	ADAMTSL 3a		TTGGCTGAAACAAGCACAAG		GCTCTCATCACATGCTTCCA	241 bp	13601 bp
NM_019032	ADAMTSL 4a		GGTCCATCATCAATGGGAAC		CAAGGATTGGAGGAGGTGAA	222 bp	367 bp
NM_213604	ADAMTSL 5a		CACGCCTTCTACCACAGCTT		GATCAGGGTCACGTTCCAGT	237 bp	924 bp

Das Prinzip der one step-RT-PCR ist nun folgendes. In einem ersten Schritt wird ein Mastermix aus ribonukleasefreiem Wasser, Puffer, Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs), dem Enzymmix aus Reversen Transkriptasen und Polymerase und dem jeweiligen Primerpaar hergestellt. Dieser wird dann auf die PCR-Röhrchen verteilt, die bereits die isolierte RNA der jeweiligen Zelllinie enthalten.

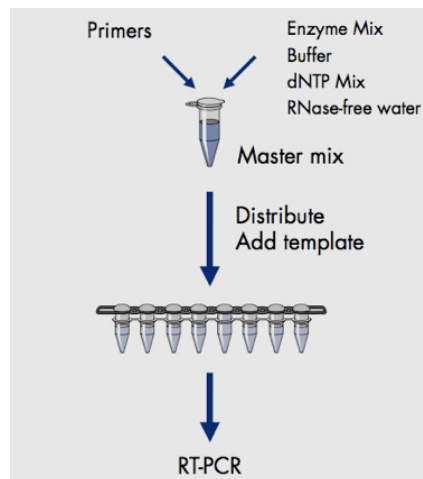


Abbildung 3.4 Prinzip OneStep RT-PCR (16)

Im PCR-Thermocycler wird der Mix nun in einem ersten Schritt auf 50 °C erhitzt und die Reverse Transkription startet. Nun beginnen sich die Primer spezifisch an die komplementären Basensequenzen auf der mRNA anzulagern und die Reversen Transkriptasen in 5`-3`-Richtung „complementary“ DNA (cDNA) unter Verbrauch von

dNTPs zu produzieren. Die entstandene cDNA ist sozusagen das Spiegelbild der mRNA. Das heißt, sie besitzt keine Introns. Als Reverse Transkriptasen fungieren hier die Enzyme Omniscript und Sensiscript. Hierbei handelt es sich im Gegensatz zu den klassischen viralen Transkriptasen um zwei rekombinante Enzyme aus *Escherichia coli* Stämmen, die durch drei Funktionen gekennzeichnet sind: RNA abhängige DNA-Polymeraseaktivität, RNase H-Aktivität und DNA abhängige DNA-Polymeraseaktivität, die jedoch für diese Anwendung keine Rolle spielt. Durch ihre unterschiedlichen Sensitivitäten für RNA-Mengen von 1 pg bis 2 µg decken beide Enzyme einen großen Funktionsbereich ab. Nach der Transkription bauen beide Enzyme durch ihre RNase H-Aktivität die mRNA aus mRNA/DNA-Hybriden ab, so dass nur cDNA übrig bleibt.

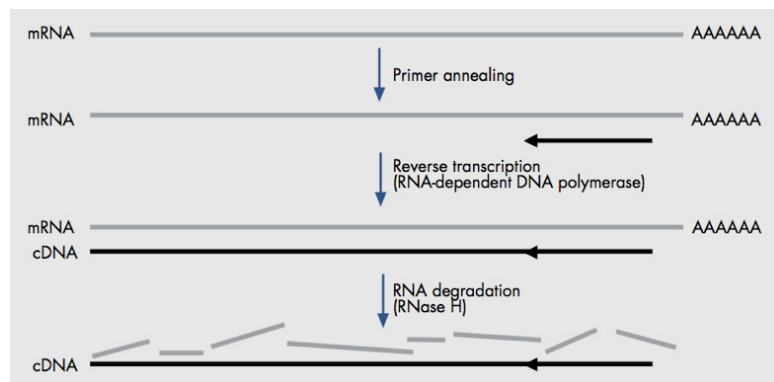


Abbildung 3.5 Prinzip Reverse Transkription (17)

Aufgrund ihrer hohen Affinität zu RNA können relativ hohe Temperaturen um die 50 °C verwendet werden. Dies führt zu einer stärkeren Auflösung von Sekundärstrukturen der RNA und damit zu einer höheren Spezifität und Ausbeute der RT-PCR. Nach diesem ersten Schritt wird das Reaktionsgemisch, mit der nun enthaltenen cDNA, für 15 min auf 95 °C erhitzt, was zur Deaktivierung der Reversen Transkriptasen und zur Aktivierung der bisher inaktiven HotStarTaq DNA-Polymerase führt (sog. hot start-Aktivierung). Bei der HotStarTaq DNA-Polymerase handelt es sich um eine ursprünglich aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq) isolierte hitzestabile Polymerase (HWZ 60 min bei 94 °C), die rekombinant in *Escherichia coli* Stämmen produziert wird. Sie besitzt die hohe Prozessivität und Syntheserate (2-4 kb/min bei 72 °C) der ursprünglichen Taq-Polymerase, leider aber auch aufgrund der fehlenden 3'-5'-Exonukleaseaktivität (sog. proofreading) die „hohe“ Fehlerrate (1/1000 bp). Durch chemische Modifizierung liegt die Polymerase bei niedrigen Temperaturen kovalent gebunden und völlig inaktiv vor. Erst durch das Erhitzen auf 95 °C werden diese Bindungen gesprengt und das Enzym aktiviert. Durch diesen „hot

start“ ist die RT-PCR als one step-Methode möglich. Zudem steigt die Spezifität erheblich an, da es vor Aktivierung zur keiner unspezifischen Amplifikation kommt. Weiters werden durch die hohen Temperaturen beim Start die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Nukleinsäuren aufgelöst, so dass diese ungepaart und denaturiert (sog. Denaturierungsschritt) vorliegen. Nun wird die Reaktion wieder auf ca. 60 °C abgekühlt und die Primerpaare können an die cDNA binden (sog. Annealing). Die optimale Annealingtemperatur muss unter Umständen experimentell eruiert werden und war in unserem Fall gleich der Primerschmelztemperatur. Generell gilt jedoch, dass sie 5-10 °C unter der Tm liegen sollte und dass bei höheren Temperaturen die Bindungsspezifität steigt, die Bindungswahrscheinlichkeit jedoch sinkt. Die Annealingtemperatur ist von der Struktur und Menge der Primer und der Pufferzusammensetzung abhängig. Die Puffer sollten für die Funktion der Taq-Polymerase basisch sein und vor allem Kationen wie Kalium-, Ammonium- und Magnesium-Ionen enthalten. Die Kationen neutralisieren die negativen Ladungen der Phosphatgruppen, was eine Anlagerung von komplementären Sequenzen erleichtert. Damit hierdurch die Spezifität nicht zu stark sinkt, sind Ammoniumionen wichtig. Diese brechen die schwachen Bindungen zwischen Basenfehlpaarungen wieder auf und wirken somit diesem Effekt entgegen. Magnesium-Ionen sind unter anderem wichtige Polymerase-Cofaktoren. Da sie durch RNA, DNA und dNTPs gebunden werden, müssen sie ausreichend zugesetzt sein.

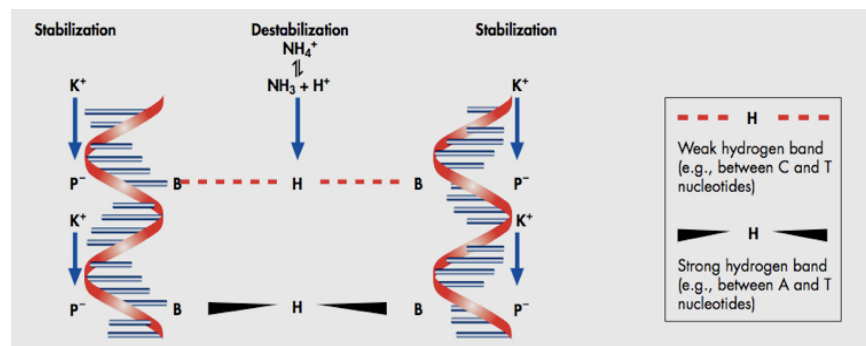


Abbildung 3.6 Pufferkationeneinfluss beim Primerannealing (18)

Nach dem Annealing der Primer wird die Temperatur wieder auf ca. 72 °C angehoben, damit die Taq-Polymerase im Bereich ihres Optimums arbeiten kann. Nun dockt die Polymerase im Bereich der Primer an und synthetisiert unter dNTP-Verbrauch in 5'-3'-Richtung die Komplementärstränge (sog. Elongation). Die Polymerasen fahren die Matrizen solange ab, bis sie aufgrund ihrer Prozessivität kurz abspringen oder bis die

Matrize oder die Elongationszeit beendet ist. Diese drei Schritte (Denaturierung, Annealing, Elongation) werden nun in der Regel zwischen 25 und 30 Mal wiederholt. Nach etwa 4-5 Zyklen vermehren sich dann vor allem die erwünschten Sequenzen exponentiell, deren Enden und Länge ja durch die Wahl des forward- und reverse-Primerpaars festgelegt wurden. Zu Beginn der PCR entstehen auch ein paar längere Amplifikate, da die Polymerasen, wie beschrieben, oftmals erst am Ende der Elongationszeit stoppen, sollten sie nicht zuvor durch beispielsweise das Ende der Matrize aufgehalten werden. Diese fallen aber letztendlich nicht ins Gewicht. Theoretisch verdoppelt sich bei jedem Zyklus die Anzahl an Kopien ($2^{\text{Zyklusanzahl}}$). In Wirklichkeit liegt der Vermehrungsfaktor jedoch bei ca. 1,7. Zu Beginn steigt die Vervielfältigungskurve exponentiell an. Da sich im Laufe die Substrate verbrauchen und die Enzyme durch die hohen Temperaturen und die hemmende Wirkung der Produktanhäufung (z.B. Pyrophosphat) an Effektivität verlieren, stellt sich gegen Ende eine Plateauphase ein. Da es nun immer mehr Amplifikate und immer weniger Primer gibt, kommt es immer öfter zum unspezifischen und ungewollten Annealing von Amplifikaten untereinander. Daraus folgt, dass immer unspezifischere Vervielfältigungen entstehen. Daher sollte man die PCR noch im ansteigenden Teil der Vervielfältigung stoppen, was experimentell zu ermitteln ist. Der letzte Elongationsschritt dauert in der Regel etwas länger, da man den Polymerasen hier noch einmal die Chance gibt, diejenigen Amplifikate, die sie nicht vollständig zu Ende schreiben konnten, fertig zu stellen (sog. abschließende Elongation) (16, 17, 18, 19, 20) (Mülhardt, 2008). Das konkrete Vorgehen richtete sich nach dem beiliegenden Protokoll des Kits und war folgendes:

Pro Gen wurde ein Mastermix für die vier Chorioncarcinomlinien und die stets mitgeführte Negativkontrolle Wasser hergestellt. Sprich ein Mastermix für 5 PCR-Röhrchen.

Tabelle 3-13 Mastermix RT-PCR

Inhaltsstoff	Volumen
Wasser ribonukleasefrei	58 µl
Puffer	20 µl
dNTPs	4 µl
Primer vorwärts (30 µM)	2 µl
Primer rückwärts (30 µM)	2 µl
Enzymmix	4 µl

Hierzu wurden alle Komponenten nach ihrer Lagerung bei -20 °C aufgetaut und vor dem Pipettieren kurz gevortext. Dann wurden die einzelnen Inhaltsstoffe des Mastermixes in einem PCR-Röhrchen zusammengemischt, wobei darauf geachtet wurde, dass der Enzymmix zum Schluss dazu pipettiert wurde. Nach kurzem Vortexen wurden je 18 µl Mastermix auf 5 PCR-Röhrchen verteilt, die je 2 µl RNA (100 ng/µl) der entsprechenden Zelllinie und einmal 2 µl ribonukleasefreies Wasser enthielten (siehe Abbildung 3.4). Die letzten 18 µl Mastermix wurden immer zur Negativprobe pipettiert. Um einen Abbau von RNA oder eine vorzeitige unspezifische Reverse Transkription zu vermeiden, standen die Proben wenn möglich auf Eis. Alle getesteten ADAMs, ADAMTSs und ADAMTSLs wurden nach dem folgenden Cycling-Protokoll im Regelfall in 27 Zyklen amplifiziert. In einem zweiten Durchlauf wurden ADAM 19a, 19b, ADAMTS 1a und 1b nochmals in 25 Zyklen, ADAM 21b in 27 Zyklen, ADAM 12, 21a, 22a, 22b, 22c, 23, 28, 32a, 32b als auch ADAMTS 3, 5, 7, 13a, 13b, 17, 20 und ADAMTSL 3 und 5 in 30 Zyklen amplifiziert, da sie im ersten Durchlauf teilweise zu schwache oder ungleiche Banden zeigten. Das Cycling-Protokoll sah folgendermaßen aus:

30 min	50 °C	Reverse Transkription	
15 min	95 °C	hot start-Aktivierung	
30 sek	94 °C	Denaturierung	} 27x
30 sek	60 °C	Annealing	
1 min	72 °C	Elongation	
10 min	72 °C	abschließende Elongation	
∞	4 °C	Abkühlung	

Gelelektrophorese und Fotodokumentation:

Nach der RT-PCR wurde die Expression der einzelnen Vertreter mittels Gelelektrophorese und 100 bp Standard überprüft. Das Vorgehen war wie folgt:

Nach der PCR wurden die abgekühlten PCR-Röhrchen kurz abzentrifugiert, damit der gesamte Inhalt am Grund des Röhrchens zu liegen kam. Dann wurden zu den 20 µl Röhrcheninhalt je 4 µl Ladepuffer 6x hinzupipettiert, das Ganze gevortext und abzentrifugiert und schließlich in die Kammern eines großen 1,5 % Agarose-Gels (200 ml TAE 1x + 3 g Agarose + 3 µl Ethidiumbromid) pipettiert. Das Auftragschema war stets 100 bp Standard, Jar, Jeg3, Bewo, Ach3p und als Negativkontrolle Wasser. Die Proben

wurden für 70 min bei 150 Volt aufgetrennt und anschließend mit dem Transluminometer ChemiDoc XRS von Bio-Rad fotodokumentiert.

3.4 Quantitative Realtime PCR

Nach dem RT-PCR Screening wurde die Expression von ADAM 28 und ADAMTS 5 in den vier Chorioncarcinomlinien noch quantitativ mittels Realtime PCR untersucht. Die hygienischen Standards waren die gleichen wie bei der RT-PCR.

3.4.1 Geräte, Gebrauchsmaterial, Kits

Tabelle 3-14 Geräte Realtime PCR

Gerätemodell	Hersteller
Kühlschrank +4 und -20 °C	Liebherr
Pipetten Pipetman P10, P20, P200	Gilson
Minishaker MS 1	Ika
Minizentrifuge Rotalibo „Uni-fuge“	Carl Roth GmbH
Thermal Cycler C1000/ iCycler iQ	Bio-Rad Laboratories

Tabelle 3-15 Gebrauchsmaterial Realtime PCR

Gebrauchsmaterial	Hersteller (Katalognummer)
PCR-Softstrips 0,2 ml gem. Farben	Biozym Scientific GmbH (710988)
Pipettenfilterspitzen steril 10 µl	Sorenson BioScience Inc. (10320)
200 µl	Sorenson BioScience Inc. (10350)
Multiplate 96-well unskirted PCR plates	Bio-Rad Laboratories (MLP-9651)
Microseal 'B' Adhesive Seals	Bio-Rad Laboratories (MSB-1001)

Tabelle 3-16 Kits Realtime PCR

Chemikalie, Lösung	Hersteller (Katalognummer)
High Capacity cDNA RT Kit	Applied Biosystems (4368814)
iQ SYBR Green Supermix	Bio-Rad Laboratories (170-8880)

3.4.2 Quantitative Realtime PCR, Auswertung

Durchführung Realtime PCR:

Eine Überprüfung der Genexpression mittels RT-PCR und anschließender Gelelektrophorese ist eine „Endpunktmessung“. Der Einsatz verschiedener RNA-Mengen kann zu gleicher Bandenstärke führen und umgekehrt. Daher ist diese Art der Expressionsanalyse lediglich semiquantitativ. Bei der Realtime PCR hingegen wird die Vermehrung der Amplifikate jeden Zyklus neu gemessen. So lassen sich quantitative Rückschlüsse auf die Menge der eingesetzten cDNA und damit auch auf die der mRNA ziehen. Das Prinzip der Reversen Transkription und PCR bleibt gleich. Der Unterschied ergibt sich aus der Messung der Amplifikate, die bei der Realtime PCR mittels Fluoreszenzbestimmung erfolgt. Diesmal wurde die Reverse Transkription und die PCR in einer Zweischrittmethode durchgeführt. Zuerst wurde die gesamte mRNA mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit von Applied Biosystems in cDNA umgeschrieben. Laut Hersteller garantiert dieses Kit über ein breites Spektrum (bis 2 µg RNA/20 µl Reaktionansatz) eine gleichbleibende Effizienz, was bei der späteren Quantifizierung eine große Rolle spielt. Diesmal kamen keine spezifischen Primer zur Anwendung, sondern sog. random primer. Dies ist ein Gemisch aus Primersequenzen, die „zufällig und Gen-unspezifisch“ an vielen Orten auf der RNA binden. Dies führt dazu, dass die gesamte RNA in vielen Einzelschritten von einem Primer zum nächsten in cDNA umgeschrieben wird. So hat man die Möglichkeit, in der darauf folgenden PCR mit Gen-spezifischen Primern eine Vielzahl an Genen zu untersuchen. Als Reverse Transkriptase diente die im Kit enthaltene MultiScribe Reverse Transkriptase. Eine rekombinierte Version der Murinen Leukämie Virus Reversen Transkriptase nach Moloney, die wie der Wildtyp eine RNA abhängige DNA-Polymerase ist, jedoch viel weniger RNase H-Aktivität besitzt. Hierdurch können längere cDNA-Transkripte synthetisiert werden, da die RNA-Matrizen nicht so schnell abgebaut werden. Im Anschluss wurde die gewonnene cDNA mit spezifischen Primern für ADAM 28 und ADAMTS 5 und dem iQ SYBR Green Supermix von Bio-Rad Laboratories vervielfältigt. Die im Kit enthaltene hot-start iTaq DNA-Polymerase ist, durch Antikörper gebunden, inaktiv gehalten und wird durch einen initialen Denaturierungsschritt aktiviert, der die PCR dann beginnen lässt. Grundlage der Realtime PCR ist ein im Kit enthaltener Fluoreszenzfarbstoff, in diesem Fall SYBR Green I. Dieser kann nach Bindung an doppelsträngige Kernsäurenstränge zur Fluoreszenz

angeregt werden, was mit fortschreitender Amplifikation entsprechend der PCR-Kinetik zunimmt und als Signal am Ende eines jeden Zyklus gemessen wird.

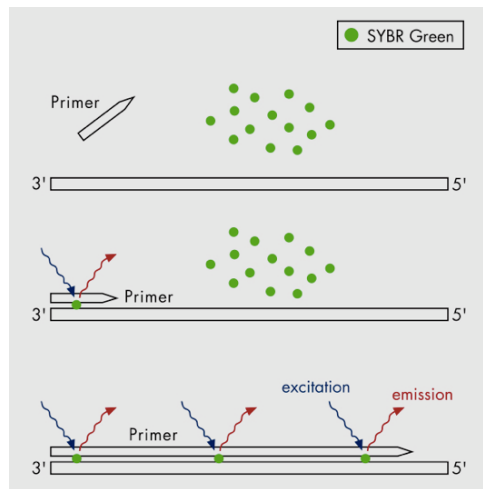


Abbildung 3.7 Signalgebung durch SYBR Green I (21)

Nachteil von SYBR Green I ist, dass er unspezifisch an alle Arten von doppelsträngigen Nucleinsäuren bindet. Bei hohen Primerkonzentrationen und komplementären Sequenzen zwischen den Primer entstehen Primer-Hybride (sog. Primerdimere). Diese werden ebenfalls während einer PCR vervielfältigt und können somit zu einer unspezifischen und falschen Signalerhöhung führen. Um dies zu erkennen und um keine falsch hohen Werte zu erhalten, beurteilt man nach der PCR das Schmelzverhalten der Produkte. Die kurzen Primerdimere denaturieren im Gegensatz zu den längeren spezifischen Amplifikaten bei viel niedrigeren Temperaturen. Da sich SYBR Green I während der Denaturierung wieder aus seiner Bindung an die doppelsträngigen Nucleinsäuren löst, kommt es zu einem Signalabfall. Dieser liegt im Falle der Primerdimere vor dem der spezifischen Amplifikate. Der typische Verlauf des Fluoreszenzsignals einer Realtime PCR zeigt dann später am Computer in der Lineardarstellung einen S-förmigen Graphen. Zentral für die Auswertung einer jeden Realtime PCR ist nun der sog. threshold cycle (Ct). Dies ist derjenige Zyklus, bei dem der Graph einen zuvor definierten Schwellenwert (threshold) kreuzt, kurz nachdem sich das Fluoreszenzsignal erstmals von der Hintergrundfluoreszenz (Basislinie) merklich abzuheben beginnt. Folglich muss ein Schwellenwert festgelegt werden. Dieser muss unbedingt im exponentiellen Anstieg des Graphen liegen, um verwertbare Ct-Werte zu bekommen und liegt oftmals nur sehr knapp über der Basislinie. Daher ist die Festlegung der Schwellenlinie in der logarithmischen Ansicht oft einfacher. Je früher der

Graph einer Probe nun die Schwellenlinie kreuzt, das heißt je kleiner der Ct-Wert ist, desto mehr cDNA und folglich mRNA war in der Probe vorhanden.

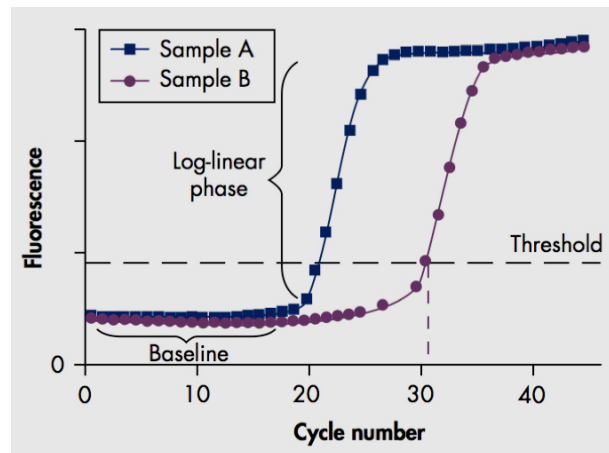


Abbildung 3.8 Lineare Graphendarstellung Realtime PCR (21)

Für die an die Realtime PCR sich anschließende Auswertung und den Vergleich zweier Proben sind nun gleiche Effizienzen bei der Synthese Voraussetzung. Dies gilt sowohl für die Reverse Transkription als auch für die sich anschließende PCR. Die Effizienzen werden üblicherweise mit Hilfe von Verdünnungsreihen und deren Auswertung mittels Standardgraphen bestimmt. Hierzu setzt man bei gleich bleibendem Gesamtreaktionsvolumen die RNA der zu untersuchenden Proben in absteigender Verdünnung ein, ermittelt nach Reverser Transkription und PCR die einzelnen Ct-Werte und trägt diese dann auf der y-Achse gegen die eingesetzten Verdünnungen auf der x-Achse auf. Die Graphen sollten parallel sein und eine Steigung von -3,8 bis -3,3 haben, was nach der Formel $(10^{(-1/\text{Steigung})} - 1) \times 100$ einer gewünschten Effizienz von ca. 83-100 % entspricht.

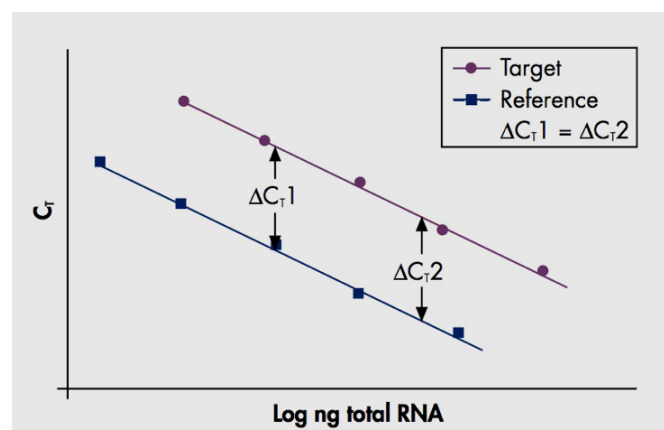


Abbildung 3.9 Standardkurven Realtime PCR (21)

Es gibt eine große Anzahl von Möglichkeiten, die eingesetzten mRNA-Mengen anhand ihrer Ct-Werte zu quantifizieren. Grob kann man für die Quantifizierung eine Unterteilung in absolut (meistens mittels Standardkurven) und relativ (meistens mittels Referenzgen) treffen. Bei der relativen Berechnung bezieht man die Ct-Werte der Proben auf ein Referenzgen (sog. Normalisierung). Dies ist ein Gen, das nicht mitreguliert wird (sog. housekeeping gen) und auf das deshalb normalisiert werden kann. Empfehlenswert ist die Verwendung eines housekeeping gen-Mixes. Wird nur ein Referenzgen herangezogen, ist es wichtig, dass dessen Expression in allen Proben gleich ist, sonst ergeben sich Auswertefehler (21, 22, 23, 24, 25) (Mülhardt, 2008; Pfaffl et al., 2004).

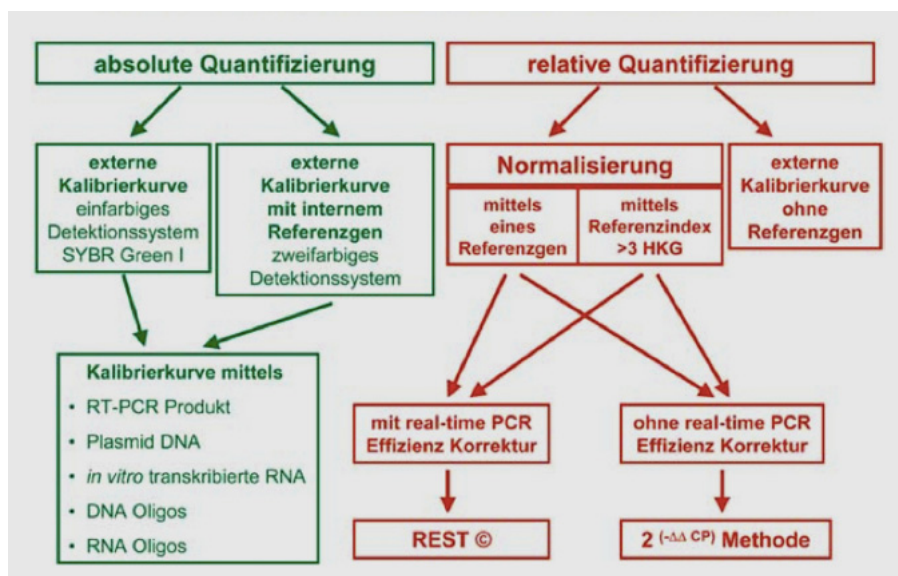


Abbildung 3.10 Quantifizierungsstrategien Realtime PCR (Pfaffl et al., 2004)

Wir werteten unsere Ergebnisse relativ mittels Referenzgen L 30 aus. L 30 kodiert für eine Komponente der ribosomalen 60S Untereinheit und zeigt in verschiedenen Plazentazelltypen eine stabile Expression (26) (Hiden et al., 2008). Das konkrete Vorgehen orientierte sich an den Protokollen der verwendeten Kits und war nun folgendes:

Nach dem Auftauen wurden alle Lösungen gevortext und auf Eis positioniert. Es wurde darauf geachtet, dass alle Lösungen vor dem abpipettieren 2-3x auf- und abgeschwemmt wurden. Zuerst wurde für die spätere Beurteilung der PCR-Effizienzen anhand von Verdünnungsreihen ein RNA-Pool aus der RNA aller vier Zelllinien gebildet. Hierzu wurden von jeder Zelllinie je 8 µl RNA (100 ng/µl) in ein PCR-Röhrchen pipettiert. Anschließend wurde die mRNA jeder einzelnen Zelllinie und des RNA-Pools in 20 µl Ansätzen zu cDNA umgeschrieben. Hierfür wurde zuerst ein Mastermix für die Reverse

Transkription (siehe Tabelle 3-17) und ein Mastermix für die sog. RT(-) Kontrolle (siehe Tabelle 3-18) hergestellt. Für die Herstellung jeglicher Mastermixe wurde darauf geachtet, dass der Enzymmix zum Schluss dazu pipettiert wurde.

Tabelle 3-17 Mastermix random RT

Inhaltsstoff	Volumen
Wasser ribonukleasefrei	27,3 µl
Puffer	13 µl
dNTPs	5,2 µl
random primer	13 µl
Enzymmix	6,5 µl

Tabelle 3-18 Mastermix RT(-)

Inhaltsstoff	Volumen
Wasser ribonukleasefrei	5,2 µl
Puffer	2 µl
dNTPs	0,8 µl
random primer	2 µl
Enzymmix	0 µl

Bei der RT(-) Kontrolle handelt es sich um eine Negativkontrolle, die alle Reaktionsausgangsstoffe mit Ausnahme der Reversen Transkriptase enthält. Zeigt die RT(-) Kontrolle bei der späteren PCR einen Signalanstieg, ist dies Indiz für die Mitamplifizierung genomischer DNA. Für die Reverse Transkription wurden dann 10 µl Mastermix random RT auf 6 Röhrchen verteilt, in denen 10 µl RNA vorgelegt waren. Viermal war dies die RNA aus einer der vier Zelllinien und zweimal Pool-RNA. Für die RT(-) Kontrolle wurden 10 µl RNA aus dem RNA-Pool vorgelegt und anschließend 10 µl RT(-) Mastermix dazupipettiert. Das RT-Cyclinprotokoll sah folgendermaßen aus:

10 min	25 °C	Aktivierung
120 min	37 °C	Reverse Transkription
30 sek	85 °C	Inaktivierung
∞	6 °C	Abkühlung

Nach der Reversen Transkription wurden als nächstes die zwei in cDNA umgeschriebenen RNA-Pools in einem Röhrchen zusammengeführt. Mit diesem cDNA-Pool wurde anschließend zwecks der späteren Effizienzenbeurteilung in 1:5 Verdünnung mit ribonukleasefreiem Wasser eine Verdünnungsreihe angelegt (50 ng/μl; 10 ng/μl; 2 ng/μl; 0,4 ng/μl). Für die PCR der Verdünnungsreihe wurde je 1 μl von jeder Konzentrationsstufe im well-plate vor- und 19 μl Verdünnungsreihen-Mastermix nachgelegt. Der Verdünnungsreihen-Mastermix (siehe Tabelle 3-19) wurde sowohl für L 30 als auch für ADAMTS 5 hergestellt.

Tabelle 3-19 Realtime PCR-Mastermix Verdünnungsreihe

Inhaltsstoff	Volumen
Wasser ribonukleasefrei	32,8 μl
Primer vorwärts (0,2 μM)	1,6 μl
Primer rückwärts (0,2 μM)	1,6 μl
iQ SYBR Green Supermix	40 μl

Für die Amplifikation der cDNA der vier Zelllinien mit Primern für ADAM 28, ADAMTS 5 und L 30 wurde ebenfalls ein Mastermix (siehe Tabelle 3-20) hergestellt. Jeweils 14 μl dieses Realtime PCR-Mastermixes wurden auf vorgelegte 6 μl cDNA (30 ng/μl) der vier Zelllinien, der RT(-) Kontrolle und einer sog. Nichtprobenkontrolle pipettiert. Bei der Nichtprobenkontrolle handelt es sich um ribonukleasefreies Wasser, das bei einem Signalanstieg in dieser Probe Aufschluss über eine Kontamination mit DNA gibt. Die Negativproben wurden zum Schluss pipettiert.

Tabelle 3-20 Realtime PCR-Mastermix

Inhaltsstoff	Volumen
Wasser ribonukleasefrei	19,2 μl
Primer vorwärts (0,2 μM)	2,4 μl
Primer rückwärts (0,2 μM)	2,4 μl
iQ SYBR Green Supermix	60 μl

Für die Amplifikation wurden alle Reaktionen in dreifacher Ausführung angesetzt, um später bei der Auswertung Pipettierfehler und PCR-Schwankungen ausgleichen zu können.

Nach dem Pipettieren wurde das well plate mit Folie abgeklebt und 10 sek bei 1000 rpm zentrifugiert, um möglicherweise entstandene Luftblasen zu beseitigen. Das PCR-Protokoll für die entstandenen 20 µl Reaktionsansätze sah folgendermaßen aus:

3 min	95 °C	hot start-Aktivierung	
30 sek	95 °C	Denaturierung	} 40x
30 sek	60 °C	Annealing	
15 sek	72 °C	Elongation	
10 sek	55 °C	Abkühlung	
	55 °C – 95 °C	Schmelzkurvenbestimmung in 0,5 °C Schritten	
∞	8 °C	Abkühlung	

Auswertung Realtime PCR:

Für die Auswertung wurden die iCycler iQ-Software und Microsoft Excel verwendet. Der Schwellenwert wurde vom Programm selbständig gewählt und erfasste alle Kurven in ihrer exponentiellen Phase. Es wurden die Ct-Werte dann in Excel übernommen und jeweils Mittelwerte aus den Triplikaten gezogen. Wenn einzelne Werte der Proben-triplikate sehr aus der Reihe fielen, was an einer Standardabweichung über 0,31 ersichtlich war, dann wurden diese vernachlässigt. Hierauf wurden die Werte von ADAM 28 und ADAMTS 5 zuerst mittels ΔCt -Methode (Mittelwert Zielgen – Mittelwert Referenzgen) gegen L30 normalisiert. Anschließend wurden sowohl für ADAM 28 als auch für ADAMTS 5 die ΔCt -Werte mittels Division durch diejenige Probe mit dem kleinsten ΔCt -Wert normalisiert. Die Probe mit dem kleinsten ΔCt -Wert fungiert hier als sog. Kalibrator. Da diejenige Probe mit dem kleinsten Ct-Wert die größte Menge an mRNA besitzt (umgekehrt proportional), wurden die errechneten Werte noch in Kehrrüch (1/kalibrierter ΔCt -Wert) umgerechnet, um Balkendiagramme mit zur RNA-Menge proportionalen Werten erstellen zu können. Da SYBR Green I als Fluoreszenzfarbstoff verwendet wurde, wurden auch die Schmelzkurven ausgewertet.

3.5 Immunfluoreszenz

Zum Schluss der Arbeit wurden noch Fluoreszenzfärbungen mit der Zelllinie Ach3p und einem Antikörper gegen ADAMTS 5 durchgeführt. Es wurde mit Handschuhen gearbeitet und die Fixierung der Zellen fand unter einer Sicherheitswerkbank mit Abzug statt.

3.5.1 Geräte, Gebrauchsmaterial, Chemikalien, Lösungen

Tabelle 3-21 Geräte Immunfluoreszenz

Gerätemodell	Hersteller
Kühlschrank +4 und -20 °C	Liebherr
Leica DFC300 FX	Leica Microsystems GmbH
Leica DM4000 B	Leica Microsystems GmbH
Magnetmixer Ikamag Ret	Ika
Minishaker MS 1	Ika
pH-Meter handylab pH11	Schott Instruments
Pipetten Pipetman P10, P20, P200, P1000	Gilson
Sicherheitswerkbank mit Abzug	?
Waage SBC 21	Scaltec Instruments

Tabelle 3-22 Gebrauchsmaterial Immunfluoreszenz

Gebrauchsmaterial	Hersteller (Katalognummer)
Deckgläser 24x50 mm	Carl Roth GmbH (1871.2)
Doppelspatel	?
Färbeküvette Typ Schiefferdecker	?
Glasbehältnisse x ml	Schott
ImmEdge Hydrophobic Barrier Pen	Vector Laboratories (H-4000)
Magnetstab	?
Nagellack	?
Pinzette anatomisch	?
Pipettenspitzen (autoklaviert) 20 µl	Carl Roth GmbH (AL17.1)
200 µl	Carl Roth GmbH (B007.1)
1000 µl	Greiner Bio-One GmbH (686271)
Ständer für Reaktionsgefäße	neoLab (2-1969)

Tabelle 3-23 Chemikalien, Lösungen und Antikörper Immunfluoreszenz

Chemikalie, Lösung, Antikörper	Hersteller (Katalognummer)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma (025K0571)
Diamidinophenylindol (DAPI)	?
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth GmbH (P030.1)
Formalin (36,5-38 % Formaldehyd in H ₂ O)	Sigma (116H3708)
Igepal CA 630	Sigma (018K6057)
Mounting Medium	Inova Diagnostics (732066)
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH (3957.1)
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Riedel-de Haën AG (04270)
Primärantikörper ADAMTS 5	Affinity BioReagents (PA1-1751)
Rhodamine Phalloidin	Biotium (00027)
Sekundärantikörper DyLight 488	JacksonImmunoResearch (111486045)
Ziegennormalserum	JacksonImmunoResearch (005000121)
Selbthergestellte Lösung	Zusammensetzung
PBS (pH 7,4)	5 l aqua bidestillatum + 45 g NaCl + 5,75 g Na ₂ HPO ₄ + 1,15 g NaH ₂ PO ₄
ca. 2,5 % Formalin (gepuffert)	100 ml PBS + 6 ml Formalin (gesättigt)
Diluent 0,3 %	100 ml PBS + 0,3 ml Igepal CA 630

3.5.2 Immunfluoreszenzfärbung, Fotodokumentation

Durchführung Immunfluoreszenzfärbung:

Zur Durchführung von Fluoreszenzfärbungen markiert man die Struktur von Interesse mit einem Farbstoff, der bei Anregung mit UV-Licht einer bestimmten Wellenlänge selbst wieder Licht einer definierten Länge emittiert (sog. Fluorophor). Ist der Farbstoff an ein Immunglobulin gekoppelt, spricht man von Immunfluoreszenz. Da die Darstellung von ADAMTS 5 mit der indirekten Zweischritt-Fluoreszenzfärbemethode geschah, soll auch nur diese erläutert werden. Im Mittelpunkt dieser Methode steht die Detektion mittels Antikörpern/Immunglobulinen (Ig). In einem ersten Schritt wird die zu untersuchende

Zielstruktur (sog. Antigen) von einem für diese spezifischen Antikörper gebunden (sog. Primärantikörper). Der Primärantikörper wird dann in einem zweiten Schritt mit einem zweiten Antikörper detektiert, an den ein Fluoreszenzfarbstoff gebunden ist (sog. Sekundärantikörper).

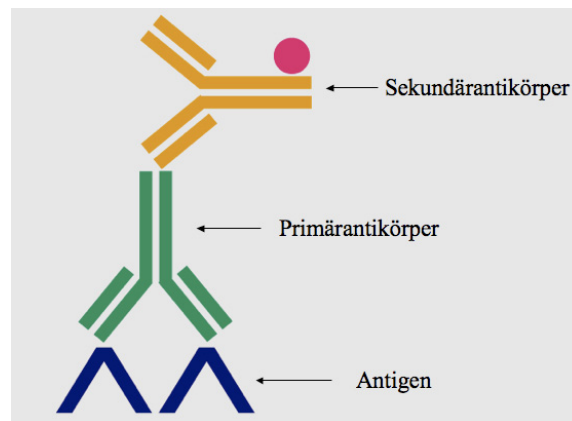


Abbildung 3.11 Indirekte Zweischritt-Immunfluoreszenzfärbung (27)

Da der Aufbau und das Verhalten von Antikörpern für das Verständnis dieser Methode wichtig ist, soll hier ein kurzer Überblick gegeben werden. Antikörper sind Glykoproteine, die von B-Lymphozyten und Plasmazellen produziert werden. Sie kommen entweder zellmembrangebunden als B-Zell-Rezeptor oder frei im Plasma, Sekreten und Gewebe vor. Es gibt 5 Klassen von Immunglobulinen: IgG, IgM, IgA, IgD und IgE. IgG ist nicht nur der bekannteste und häufigste Vertreter im Serum, sondern wird in der Immunchemie auch am häufigsten verwendet, weshalb der Aufbau und das Verhalten von Antikörpern an ihm gezeigt werden soll. Immunglobuline sind aus vier Polypeptidketten zusammengesetzt. Sie bestehen aus zwei langen sog. schweren Ketten (heavy chains) und aus zwei kurzen sog. leichten Ketten (light chains). Es gibt hinsichtlich ihrer Länge und Zusammensetzung verschiedene Arten schwerer Ketten (γ , μ , α , δ , ϵ). Diese definieren die Antikörper-Klassen. Außerdem lassen sie auch noch eine weitere Unterteilung in Unterklassen zu (z.B. γ_1 , γ_2 , γ_3 , γ_4). Bei den leichten Ketten lassen sich nur zwei verschiedene Typen (κ , λ) unterscheiden. Subklassenspezifisch sind die Polypeptidketten untereinander mittels mehr oder weniger vielen Schwefelbrückenbindungen verbunden. Diese existieren auch innerhalb der Ketten. Aus diesem Grund besitzen Immunglobuline in Wirklichkeit nicht die schematisch lineare Form eines Y, sondern sind eher globulär aufgebaut. Durch diese innermolekularen Schwefelbrücken lassen sich die Immunglobuline in mehrere Abschnitte unterteilen (sog. Domänen). Die schweren und leichten Ketten weisen jeweils an ihren N-

terminalen Enden variable Domänen auf, die als V_H (Variabel heavy) und V_L (Variabel light) bezeichnet werden. An den Enden der variablen Domänen bilden sich nun spezifische Schleifen in der Faltstruktur der Aminosäuresequenz aus. Diese stellen den Teil des Antikörpers dar, der das Antigen bindet. Diese höchst variablen Abschnitte, die auch hypervariable Regionen genannt werden, sind für eine spezielle B-Zelle und ihre Klone spezifisch. Die restlichen Domänen werden als C_H (Constant heavy) oder C_L (Constant light) bezeichnet. Im Falle der schweren Ketten sind sie von N-nach C-terminal durchnummeriert, da die schweren Ketten mehr als nur eine konstante Domäne besitzen. Zwischen der konstanten Domänen C_{H1} und C_{H2} findet sich eine sehr bewegliche Region, die einem Scharnier ähnelt (sog. hinge region). Mit dieser können sich die Antikörper an die Antigenoberfläche anpassen. Im Bereich dieser Region befinden sich auch die ersten Schwefelbrücken zwischen den schweren Ketten. Eine weitere Möglichkeit, Antikörper zu charakterisieren und zu unterteilen, geht aus dem Antikörperverdau mit Enzymen wie Pepsin und Papain hervor. Diese spalten den Antikörper im Bereich der hinge region in ein oder zwei variable antigenbindende Fragmente (**Fab**) und ein konstantes cristallisierbares Fragment (**Fc**). Pepsin spaltet nun etwas unterhalb der ersten Schwefelbrücke und es entsteht ein zusammenhängendes divalentes $F(ab')_2$. Papain spaltet etwas oberhalb und es entstehen zwei getrennte monovalente Fab-Anteile.

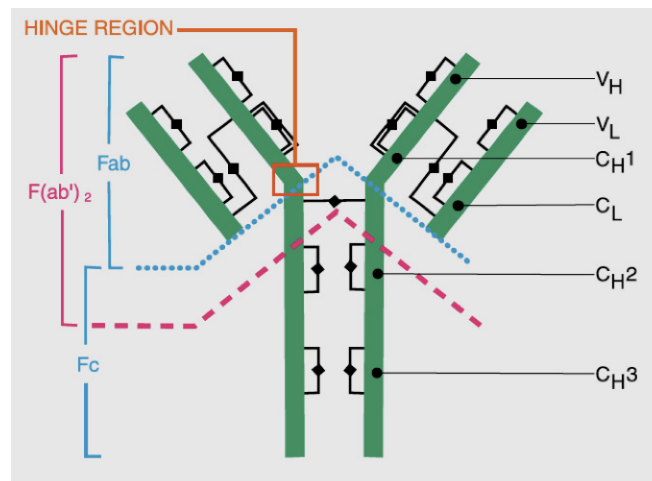


Abbildung 3.12 Antikörperfragmente nach Enzymverdau (27)

Die variablen Domänen der Fab oder $F(ab')_2$ binden nun an ein passendes Antigen oder genauer gesagt Epitop. Ein Antigen ist eine Struktur, die die Produktion von spezifischen gegen das Antigen gerichteten Antikörpern hervorrufen kann. Es kann nun verschiedene „Unterstrukturen“ beherbergen, gegen die die Antikörper gerichtet sein können (sog.

Epitope). Die Bindung zwischen Epitop und den variablen Domänen ist nichtkovalent und reversibel. Elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, van der Waals-Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen spielen hier eine Rolle. Damit es zu einer festen Bindung kommt, müssen sich Antikörper und Epitop sehr nahe kommen und es muss zu einem Überwiegen der anziehenden über die abstoßenden Kräfte kommen. Voraussetzung ist, dass das Epitop ähnlich dem Schlüssel-Schloss-Prinzip gut in die „Bindungstasche“ der variablen Region passt. Desweiteren spielen hier auch Faktoren wie die Antigen-Antikörper-Menge, Ionenkonzentrationen, pH, Temperatur und Zeit eine wichtige Rolle. Während der Fab-Teil für die spezifische Bindung von Antigenen verantwortlich ist, ist der Fc-Teil in vivo und auch in vitro vor allem für die Effektorfunktionen von Antikörpern entscheidend. Bestimmte Fc-Typen aktivieren die Komplementkaskade. Sie können auch über typspezifische Fc-Rezeptoren von Immunzellen gebunden werden und für Phagozytose und Degranulation wichtig sein. Auch Nichtimmunzellen wie z.B. Trophoblasten besitzen solche Rezeptoren. Hier spielen sie eine wichtige Rolle für die Plazentagängigkeit von IgG. Bei IgA sind die Fc-Anteile Bindungsstelle für die J-Kette und die sekretorische Komponente (Roitt et al., 1995). In vitro sind hauptsächlich die Bindung über Fc-Rezeptoren und das Binden anderer Antikörper gegen das Fc-Ende erwähnenswert. Für die Verwendung von Primärantikörpern in vitro unterscheidet man nun zwei Arten: poly- und monoklonale Antikörper. Polyklonale Antikörper werden produziert, indem man einem Versuchstier eine Mischung aus zu untersuchendem Antigen und einem immunstimulierenden Adjuvans (z.B. nach Freund oder Aluminiumhydroxid) injiziert. In der Regel erkennen nun verschiedene B-Zellen einzelne Epitope des Antigens. Expressieren sie B-Zell-Rezeptoren, die ein passendes Epitop sehr stark und schnell binden, bekommen sie die Erlaubnis, sich zu teilen (Klone ihrer selbst zu erzeugen) und lösliche Antikörper zu produzieren. Kurzum die entstehenden Antikörper entstammen vielen verschiedenen Klonlinien und erkennen viele verschiedene Epitope desselben Antigens, sie sind polyklonal. Nach mehrmaliger Wiederholung der Antigenverabreichung (sog. Boosterung) wird dann Blut vom Versuchstier genommen. Über Affinitätschromatographie werden dann diejenigen Antikörper aus dem Pool an Blutantikörpern selektiert, die für das injizierte Antigen spezifisch sind. Monoklonale Antikörper hingegen entstammen nur einer speziellen Klonlinie. Hierfür wird ein Versuchstier wiederum immunisiert. Diesmal werden jedoch einzelne Plasmazellen aus Milz oder Lymphknoten isoliert. Damit diese in vitro ihre Proliferation nicht einstellen, werden sie mit Myelomzellen hybridisiert. Nach der

Selektion einzelner epitopspezifischer Klone, werden diese entweder *in vitro* oder *in vivo* mittels Implantation in die Bauchhöhle eines Versuchstieres weitervermehrt. So kann man entweder aus dem Kulturmedium oder der Peritonealflüssigkeit monoklonale Antikörper gewinnen.

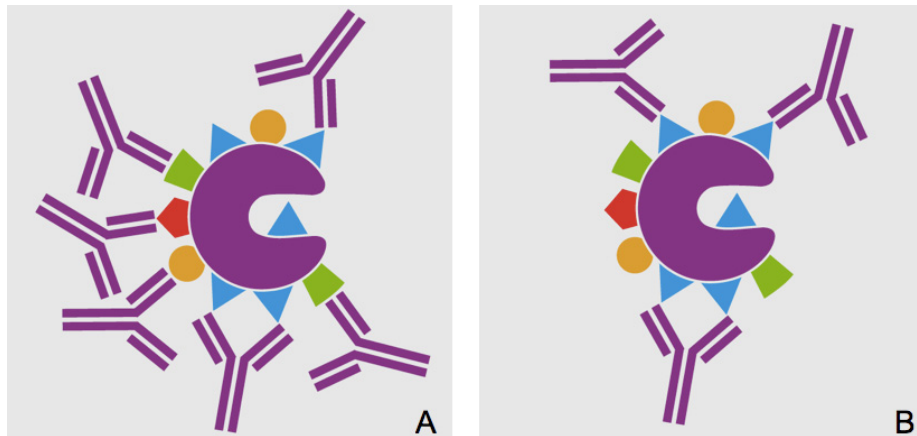


Abbildung 3.13 Antikörperklonalität (27)

(A) Polyklonale Antikörper binden an verschiedene Epitope eines Antigenes

(B) Monoklonale Antikörper binden an ein spezielles Epitop eines Antigenes

Vorteile monoklonaler Antikörper sind, dass sie von Probe zu Probe homogen sind und keine unspezifischen Immunglobuline enthalten. Dafür erkennen sie evtl. ein Antigen nicht wieder, wenn sich das Epitop, gegen das sie binden, z.B. während der Probenfixierung verändert hat. Polyklonale Antikörper erkennen es evtl. immer noch. Sollten die monoklonalen Antikörper eine Kreuzreaktivität aufweisen, das heißt, dass sie auch ein anderes Antigen als das Gewünschte erkennen, dann kann man dieses Phänomen nicht über Adsorptionsverfahren eliminieren, während dies bei polyklonalen möglich ist. Hier filtert man diejenigen Antikörper, die auch an andere Epitope als die des Antigenes binden, über Adsorption heraus und hat meist immer noch Antikörper, die das gesuchte Antigen binden. Diese zwei Prinzipien zur Antikörpergewinnung lassen sich nun sowohl für die Produktion von Primär- als auch für die von Sekundärantikörpern anwenden. Wobei bei der Generierung von Sekundärantikörpern der Primärantikörper als Antigen dient. Wichtig ist hier, dass sich die Spezies, in denen der Primär- und der Sekundärantikörper erzeugt werden sollen, unterscheiden, damit der Primärantikörper vom Versuchstier auch als Fremdeiweiß erkannt werden kann. Was der Sekundärantikörper bei seinem Einsatz dann erkennt, hängt davon ab, ob man nun ganze Primärantikörper oder nur Fragmente zur Immunisierung eingesetzt hat (27). Als Primärantikörper verwendeten wir polyklonale

affinitätsgereinigte Antikörper, die im Kaninchen erzeugt wurden und gegen ADAMTS 5 in Mensch, Schwein und Rind binden. Als Immunogen wurde der Aminosäureabschnitt 636-649 des 930 Aminosäuren langen Gesamtproteins genutzt. Laut Hersteller Affinity BioReagents zeigen die Antikörper keine Kreuzreaktivität mit anderen ADAMTS-Mitgliedern und sind für die Western Blot-Anwendung getestet (28). Als Sekundärantikörper wurden polyklonale affinitätsgereinigte F(ab')₂ der Firma Jackson ImmunoResearch verwendet, die in der Ziege erzeugt wurden und gegen komplette Kaninchenantikörper (heavy + light chains) gerichtet sind. Sie wurden gegen menschliche Serumproteine adsorbiert, um nicht unspezifisch mit solchen zu reagieren. Markiert sind sie mit dem Fluoreszenzfarbstoff Dylight 488, der durch UV-Licht der Wellenlänge 493 nm maximal zur Fluoreszenz angeregt wird und dann bei 518 nm maximal grünes Licht emittiert. Vorteil dieses Antikörpers und der indirekten Detektionsmethode ist, dass am Primärantikörper mehrere Epitope zum Andocken erkannt werden können. Das bedeutet, dass es somit zu einer Signalverstärkung und zu einer größeren Sensitivität kommt, wenn mehrere Sekundärantikörper an den Primärantikörper binden. Außerdem kann der Primärantikörper auch innerhalb der Klassen und Subklassen gewechselt werden und würde immer noch erkannt werden, solange er im Kaninchen erzeugt wurde. Ein weiterer Vorteil ist, dass dieser Sekundärantikörper nicht zu einer unspezifischen Färbung über die Bindung an Fc-Rezeptoren führen kann. Nachteil ist, dass er auch an Fc-Rezeptoren gebundene Primärantikörper detektiert. Außerdem wurde er nicht gegen tierische Proteine adsorbiert. Da beispielsweise Rinderserumalbumin zur Lagerung der Antikörper oder wie später noch beschrieben zum „Blocken“ beim Färben verwendet wird und dieses auch bovines IgG als Verunreinigung enthalten kann, kann es hier zu unspezifischen Anfärbungen kommen (29, 30). Das Ziel bei Untersuchungen mittels Immunfluoreszenzfärbung ist nun, ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten. Sprich, möglichst viel spezifisches Signal bei möglichst wenig unspezifischer Hintergrundfluoreszenz zu erhalten. Problem hierbei sind die vielen Variablen im Färbeprozess wie Fixierungsmöglichkeiten, Inkubationszeiten, Temperatur, Ionenkonzentrationen, pH und nicht zuletzt die Antikörper und ihre Verdünnungen. Der erste Schritt im Färbeprozess ist nun die Fixierung. Um die Probe vor Autolyse, Fäulnis und den Widrigkeiten des Färbeprozesses an sich zu schützen, müssen diese in ihrem zu untersuchenden Zustand fixiert werden. Bei sehr dünnen Proben ist die einfachste Möglichkeit die Trocknung bei Raumtemperatur. Neben der Konservierung sorgt sie bei auf Objektträgern aufgetragenen Proben auch dafür, dass die Proben fester anhaften.

Ergänzt oder ersetzt wird die Trocknung zumeist durch Fixierung mit Chemikalien wie Methanol, Ethanol, Aceton, Formaldehyden oder Kombinationen aus diesen. Diese Chemikalien denaturieren die Zellproteine entweder über Koagulation, Quervernetzung oder einer Mischung aus beidem. Auf diese Weise erhalten sie (zwar in leicht veränderter Form) die Struktur der Proben. Zudem machen sie die Zellwände mehr oder weniger porös und damit für Färbestoffe permeabel. In unserem Fall wurde letztendlich gepuffertes 2,5 % Formalin zur Fixierung verwendet. Formalin ist die wässrige Lösung des Gases Formaldehyd, die bei ca. 36-38 % gesättigt ist und einen sauren pH aufweist. Formalin fixiert indem es Methylen-Brücken zwischen den basischen Aminosäuren der Proteine schlägt. Die Zelle wird einer so genannten Sol-Gel-Transformation unterzogen. Lag zuvor der Zellinhalt in Kompartimenten von Membranen umhüllt in gelöster Form (Sol) vor. So liegt er nun gel-ähnlich in einem Proteinmaschenwerk, das von einer porösen Zellmembran umgeben ist. Vorteil von Formalin ist, dass es bei geeignetem Protokoll eine gute Fixierung bei gleichzeitig geringer Veränderung von Proteinen zeigt. Dies ist eine Gradwanderung, die jedes Fixans bestehen muss, da neben der Fixierung auch der Erhalt der Epitope entscheidend ist, damit sie durch die eingesetzten Antikörper erkannt werden können. Ist dieses Erkennen nicht mehr gegeben, können die Epitope durch Enzymverdau und sog. antigen-retrieval sozusagen wieder freigelegt werden. Nachteile von Formalin sind sein unphysiologisch saurer pH, der durch die Bildung von Ameisensäure und die Bindung von CO₂ entsteht und die Tatsache, dass durch die Quervernetzung die hydrophoben Eigenschaften von Proteinen zunehmen, was in einem höheren Hintergrundsignal enden kann. Der saure pH lässt sich durch die Verdünnung mit PBS kompensieren, was gleichzeitig auch einem zu starken osmotischen Stress während der Fixierung vorbeugt. Außerdem permeabilisiert Formalin die Zellen oft nicht ausreichend. Daher ist die Verwendung eines Detergenz ratsam (27) (Burke, 1933). Sind die Proben schließlich fixiert, stellt sich die Frage, wie lange bei welcher Temperatur inkubiert werden soll. Hier gilt, je kürzer die Inkubationszeit sein soll, desto höher muss die Temperatur und Konzentration der Antikörper gewählt werden. Nachteil einer kurzen Inkubation ist jedoch ein größerer unspezifischer Hintergrund. Dieser Sachverhalt gilt auch vice versa. Gängige Inkubationszeiten und Temperaturen sind 10-30 min bei Raumtemperatur oder 37 °C. Eine Inkubation über Nacht bei 4 °C ist ebenfalls beliebt. Ist das Gleichgewicht zwischen gebundenen und nichtgebundenen Antikörpern erreicht, bringt eine weitere Inkubation nichts mehr. Hat man sich für ein Protokoll entschieden, ist nun der nächste und auch gleichzeitig einer der zentralsten Schritte das Finden derjenigen Antikörperverdünnungen,

bei denen das Signal-Rausch-Verhältnis das Beste ist. Generell gilt: je höher die Menge an eingesetzten Antikörpern, desto größer das Rauschsignal. Auch unspezifische Antikörper, die bei der Immunisierung (durch das Adjuvans angeregt) vermehrt produziert werden und im Gemisch der spezifischen Antikörper vorkommen können, tragen zu diesem Effekt bei. Die richtige Verdünnung ist nun diejenige, bei der man eine maximal spezifische Färbung bei minimal unspezifischem Hintergrund erhält. Auf molekularer Ebene wird die unspezifische Antikörperbindung durch hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen beeinflusst, je nachdem welche Kräfte überwiegen. Die isoelektrischen Punkte der meisten polyklonalen IgG liegen zwischen 5,8 und 8,5. Das heißt, dass bei dem pH um 7,4, der durch den PBS-Puffer vorgegeben wird, ein Teil der Antikörper eine positive, ein Teil eine negative und ein Teil keine Nettoladung trägt. Folglich wird ein Teil eher an elektrostatischen und ein Teil eher an hydrophoben Wechselwirkungen teilnehmen. Nicht nur der pH und die Antikörper selbst spielen bei der Bindung eine entscheidende Rolle, sondern auch die Proben und das Milieu. Je mehr Ionen z.B. vorkommen, desto größer wird der Einfluss elektrostatischer Kräfte und desto geringer der von hydrophoben Kräften (vice versa). So wirkt sich auch die Fixierung auf das Verhältnis der Wechselwirkungen aus. Formalin beispielsweise erhöht die Hydrophobie der Proben. Vor allem die IgG-Subklassen 1 und 3 zeigen sich hier für hydrophobe Bindungen empfänglich. Durch die Verwendung von weniger Formalin und durch Zusatz von Detergenzien lässt sich dieser Effekt jedoch abschwächen. Letztendlich tragen auch Fc-Rezeptoren, Kreuzreaktivität und lytische Areale ihren Teil zur Hintergrundfluoreszenz bei. Eine Sonderstellung nimmt hier die Antigendiffusion ein, da es sich um kein unspezifisches Signal handelt, sondern nur um dessen Verschiebung an einen unphysiologischen Ort. Eine Möglichkeit zur Rauschsignalreduktion ist, neben dem Einsatz eines Detergenz und eines optimierten Protokolls, das sog. Blocken. Hier wird mit Hilfe von Rinderserumalbumin, entfetteter Trockenmilch oder Antikörpern versucht, Strukturen abzuschirmen, die eine zu hohe Hintergrundfluoreszenz verursachen. Rinderserumalbumin und Trockenmilch überziehen hydrophobe Strukturen wie ein Film. Die Gefahr hierbei ist, dass Rinderserumalbumin Antikörper enthalten kann, die durch Sekundärantikörper gebunden werden können und so eine unspezifische Färbung verursachen. Eine elegante Möglichkeit zu Blocken ist die Verwendung von Normalserum. Dies wird von der gleichen Spezies gewonnen von der auch der Sekundärantikörper stammt. Somit wird es nicht als fremd angesehen und nicht gebunden. Normalserum ist nun Serum von Tieren, die nicht spezifisch immunisiert wurden. Es enthält folglich zwar

Antikörper, jedoch sind diese normalerweise nicht gegen ein spezielles Antigen der zu untersuchenden Proben gerichtet. Bei der Verwendung besetzt es nun evtl. vorhandene Fc-Rezeptoren und bindet unspezifische Antigene, womit der Anteil an unspezifischem Signal reduziert werden kann (27). Neben der Immundetektion mittels Antikörpern kann man auch auf andere Weise Strukturen spezifisch darstellen. Eine Möglichkeit bietet das Toxin des Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*) Phalloidin. Phalloidin ist ein bizyklisches Peptid, das sehr spezifisch filamentäres Aktin (F-Aktin) bindet und stabilisiert. Auf diese Weise hemmt es den Abbau des Polymers F-Aktin in seine G-Aktin-Monomeruntereinheiten. Aufgrund der kleinen Größe von Phalloidin bleibt Aktin trotz Bindung noch funktionell, weshalb sogar Untersuchungen an lebenden Zellen durchgeführt werden können. In unserem Fall verwendeten wir das mit dem Fluorophor Rhodamin markierte Rhodamine Phalloidin der Firma Biotium. Das rot-orange fluoreszierende Rhodamin wird von UV-Licht der Wellenlänge 540 nm maximal angeregt und emittiert dann maximal Licht der Wellenlänge 565 nm. Da die Zellmembran für Phalloidin nicht durchlässig ist, muss diese bei toten Zellen zuvor permeabilisiert werden (31). Eine weitere Möglichkeit, Strukturen spezifisch ohne Antikörper anzufärben, ist die Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes DAPI. DAPI vermag sowohl an DNA als auch an RNA zu binden. Zunutze macht man sich jedoch meist die Bindung an doppelsträngige DNA zur Anfärbung des Zellkerns, die über Anlagerung an AT-reiche Regionen in der kleinen Windung der Doppelhelix stattfindet und ein wesentlich stärkeres Signal ergibt als die Bindung an RNA. Bei Bindung an DNA und Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge 358 nm wird der Farbstoff maximal angeregt und emittiert dann maximal blaues Licht der Wellenlänge 461 nm. Prinzipiell ist die Zellmembran für DAPI nicht permeabel, jedoch können mit sehr hohen Konzentrationen auch lebende Zellen angefärbt werden (32). Das von uns verwendete letztendliche Färbeprotokoll achtete darauf, dass alle eingesetzten Lösungen gut durchmischt waren, keine unnötige Lichtbestrahlung der Farbstoffe stattfand und war nun folgendes:

Zuerst wurden die Objektträger mit den Ach3p-Zellen bei Raumtemperatur für ca. 15 min aufgetaut. Dann wurden die Zellen, die sich jeweils im Bereich der Objektträgerenden befanden mittels ImmEdge pen eingekreist, damit die später auf die Objektträger pipettierten Lösungen nicht verliefen. Hierauf wurden die Zellen in ca. 2,5 % eiskaltem gepuffertem Formalin für 10 min fixiert. Anschließend wurden die Objektträger kurz in ein Becherglas mit PBS getaucht und dann für 2 x 5 min in PBS stehen gelassen (sog. Waschen). Hierauf wurden sie vorsichtig kurz mit ihrer Längskante auf einen Tisch

geklopft, um überschüssige Pufferreste zu entfernen, die zu einer Verdünnung der Färbelösungen führen würden. Dann wurden 100 µl Primärantikörper (1:100 in Diluent mit 10 % Ziegennormalserum und 1 % BSA) pro markiertem Feld auf die Zellen pipettiert und diese über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Objektträger wieder kurz in ein Becherglas mit PBS getaucht und dann für 2 x 5 min in PBS gewaschen. Nach kurzem Abklopfen wurden 100 µl Sekundärantikörper (1:600 in Diluent) pro markiertem Feld auf die Zellen pipettiert und diese, damit die Färbelösung nicht austrocknet und ausbleicht, für 60 min in einer feuchten und dunklen Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem wie oben beschriebenen Waschschrift und kurzem Abklopfen wurden dann 100 µl Rhodamin Phalloidin (1:20 in Diluent mit 1 % BSA) pro markiertem Feld auf die Zellen pipettiert und wie zuvor nach Auftragen des Sekundärantikörpers inkubiert. Dann wurde wieder wie bekannt gewaschen, abgeklopft und anschließend 100 µl DAPI (1:100 in PBS) pro markiertem Feld auf die Zellen pipettiert und diese für 20 min in einer feuchten und dunklen Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift, der diesmal aus kurzem Eintauchen in ein Becherglas mit PBS und Waschen in PBS für 5 min bestand, wurden die Objektträger wieder wie beschrieben abgeklopft und bei Raumtemperatur kurz stehen gelassen, um den Pufferüberstand etwas zu reduzieren. Dann wurden sie noch feucht unter Verwendung von mounting medium eingedeckelt und an den Seiten mit Nagellack versiegelt. Auf jedem Objektträger lief eine Negativkontrolle mit, die wie alle anderen Proben behandelt wurde, mit der Ausnahme, dass sie nicht mit dem Primärantikörper, sondern nur mit 100 µl Diluent mit 10 % Ziegennormalserum und 1 % BSA inkubiert wurde.

Fotodokumentation:

Gleich im Anschluss an die Färbung wurden die Objektträger im Dunklen mikroskopiert und die aufgenommenen Fotos dokumentiert. Die eingestellten Parameter, wie die Belichtungszeit von 200 ms, die Signalverstärkung von 6,3 und die Gamma-Korrektur von 1,32 wurden für alle Aufnahmen des Sekundärantikörpersignals beibehalten. Bei den Aufnahmen im Phasenkontrast und mit den Rhodamin- und DAPI-Filtern wurden die Parameter zur Optimierung der Bildqualität variiert.

4 Ergebnisse

4.1 RNA-Isolierung

Nach Anzucht der vier Zelllinien Jar, Jeg3, Bewo und Ach3p, wurde deren RNA jeweils einzeln mittels „single-step“ Methode mit TRI-Reagent der Firma Molecular Research Center gemäß beiliegendem Protokoll isoliert. Zur Bestimmung der jeweiligen Konzentration der isolierten RNA und deren Reinheit wurde das Spektralphotometer NanoDrop ND-1000 der Firma PEQLAB verwendet. Die Proben wurden ein erstes Mal unverdünnt vermessen, wobei die 260/280 nm Quotienten der Zelllinie Jar bei 1,96/1,97/1,99; der Linie Jeg3 bei 2,0/2,1/2,2; der Linie Bewo bei 1,96/1,97/1,97 und der Linie Ach3p bei 1,94/1,94/1,94 lagen. Nach der Messung wurden alle vier Proben mit bidestilliertem DEPC-behandeltem Wasser auf 100 ng/μl verdünnt und nochmals vermessen. Die Werte der Linie Jar lagen bei 118/119 ng/μl und der 260/280 nm Quotient bei 1,79/1,85; die der Linie Jeg3 bei 104/107 ng/μl und der 260/280 nm Quotient bei 1,88/1,88; die der Linie Bewo bei 105/106 ng/μl und der 260/280 nm Quotient bei 1,77/1,82; und schließlich die der Linie Ach3p bei 113/113 ng/μl und der 260/280 nm Quotient bei 1,83/1,83. Nach der Vermessung wurde die RNA noch auf ihre Qualität hin überprüft. Nach elektrophoretischer Auftrennung in einem Ethidiumbromid-Agarosegel wurden die Proben anschließend mit dem Transluminometer ChemiDoc XRS von Bio-Rad fotodokumentiert.

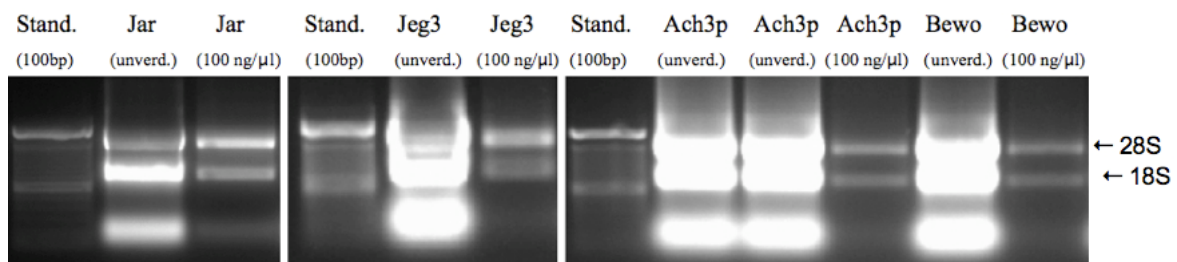


Abbildung 4.1 Fotodokumentation RNA-Qualität

Wie in Abbildung 4.1 ersichtlich ist, zeigte sich bei allen Linien die RNA von guter nicht degradierter Qualität. Erkennbar sind die ribosomalen 18S und 28S RNA-Banden. Wobei, wie gewünscht, die 28S Banden von größerer Intensität waren.

4.2 RT-PCR

Im Anschluss an die RNA-Isolierung folgte der Hauptteil der Arbeit, das RT-PCR Screening. Es wurde ermittelt welche Vertreter in den Zelllinien vorkommen und ob hier semiquantitativ Unterschiede bestehen. Hierzu wurde das OneStep RT-PCR Kit von Qiagen nach Herstellerangabe verwendet. Die in der Konzentration von 100 ng/µl eingesetzte RNA der Zelllinien wurde in cDNA umgeschrieben und in 27 Zyklen amplifiziert. Bei einigen in der Methodik erwähnten und nachfolgend gezeigten Vertretern wurde ein zweiter PCR-Durchlauf mit 25, 27 oder 30 Zyklen gestartet, da deren Banden im ersten Versuch entweder nur schwach erkennbar oder von unterschiedlicher Intensität waren. Im Anschluss an die PCR wurden die Amplifikate und ein mitlaufender 100 bp Standard elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt und mit dem Transluminometer ChemiDoc XRS von Bio-Rad fotodokumentiert. Zur „Kontrolle“ des allgemeinen Expressionsniveaus, der Pipettiergenauigkeit und des Funktionierens der PCR wurde am Anfang auch ein Durchlauf mit dem housekeeping-Gen L 30 durchgeführt. In unseren Untersuchungen zeigten sich nun die Expressionsanalysen wie folgt:

4.2.1 Nachgewiesene Vertreter

Das zu Kontrollzwecken mitgeführte L 30 zeigte sich in allen vier Linien als gleichmäßig vorhanden. Unter den ADAM's konnten ADAM 8, 9, 10, 12, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 28 und 32 nachgewiesen werden. ADAM 8, 9, 10, 15, 17, 19 und 21 zeigten ein gleichmäßiges Vorkommen ihrer Banden in allen vier Zelllinien, während ADAM 12, 20, 22, 23, 28 und 32 in manchen Linien nicht vorkamen oder ihre Banden eine unterschiedliche Intensität zwischen den verschiedenen Zelllinien zeigten. ADAM 12 konnte im ersten Durchlauf in keiner Linie nachgewiesen werden. Im zweiten Durchlauf mit 30 Zyklen waren die Banden in den Linien Jar und Ach3p gut, in der Linie Jeg3 nur schwach erkennbar. Eine Bande im Falle von Bewo konnte nicht sicher ausgeschlossen werden. Die Expression von ADAM 20 war mit deutlichen Banden in allen vier Linien erkennbar. Jedoch waren die Banden in den Linien Jar und Ach3p etwas schwächer als in den Linien Jeg3 und Bewo. Da keine zweite PCR durchgeführt wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass dies nicht etwa durch Pipettierungenauigkeiten verursacht wurde. ADAM 22, bei dem drei verschiedene Primer und zwei PCR-Durchläufe zur Anwendung kamen, zeigte eine Bandendominanz in den Linien Jar und Bewo. Bei ADAM 23 konnte im ersten Durchlauf nur eine schwache Bande in der Linie Jeg3 nachgewiesen

werden. Im zweiten Durchlauf zeigten sich auch schwache Banden in den Linien Bewo und Ach3p. In der Linie Jar konnten wir ADAM 23 nicht nachweisen. ADAM 28 zeigte zweimalig ein deutliches Bandensignal in der Linie Jar, ein schwächeres Signal in den miteinander verwandten Linien Jeg3 und Ach3p und keine Bande im Falle von Bewo. ADAM 32 ließ in beiden PCR-Ansätzen und bei beiden Primerpaaren eine Schwäche der Bewo-Bande erkennen. Bei den Vertretern der ADAMTS-Familie konnten ADAMTS 1, 3, 5, 6, 7, 9, 13, 17 und 20 nachgewiesen werden. Bei ADAMTS 1 und 6 erschien ein in allen Linien einheitliches Verteilungsmuster, während dies bei ADAMTS 3, 5, 7, 9, 13, 17 und 20 nicht der Fall war. ADAMTS 3 kam in beiden Durchläufen gleichmäßig in den Linien Jar, Jeg3 und Ach3p vor, nicht jedoch in der Linie Bewo. ADAMTS 5 kam beide Male deutlich in der Linie Ach3p und im zweiten Durchlauf andeutungsweise in der Linie Jeg3 vor. ADAMTS 7 zeigte sich zweimal mit gleichmäßig intensiven Banden in den Linien Bewo und Ach3p, etwas schwächer in Jeg3 und am schwächsten in Jar. ADAMTS 9 erschien mit beiden Primerpaaren deutlich in Jeg3 und Ach3p vertreten und im Falle von Primerpaar 9a auch schwach in Bewo. In der Linie Jar konnten wir ADAMTS 9 nicht nachweisen. Eine in beiden Ansätzen und bei beiden Primerpaaren vorhandene starke Intensität zeigte sich im Falle von ADAMTS 13 bei Jar, gefolgt von einer gleichmäßigen Intensität bei Bewo und Ach3p. Die Jeg3-Bande zeigte sich als die Schwächste. Das Fehlen einer Jar-Bande gefolgt von gleichen Banden in den drei übrigen Linien war beide Male bei ADAMTS 17 zu erkennen. ADAMTS 20 zeigte beide Male gleiche Banden in den Linien Jar und Ach3p. In der Linie Jeg3 konnte das Vorkommen einer ADAMTS 20 Bande nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Bei den Vertretern der ADAMTSLs konnten ADAMTSL 3, 4 und 5 nachgewiesen werden. Ein einheitliches Vorkommen von Banden bestätigte sich nur bei ADAMTSL 4. ADAMTSL 3 zeigte in beiden Durchläufen nur Banden bei Jar und Jeg3. ADAMTSL 5 ließ zweimal eine Schwäche in der Jeg3-Bande erkennen.

4.2.2 Nicht nachgewiesene Vertreter und unspezifische Banden

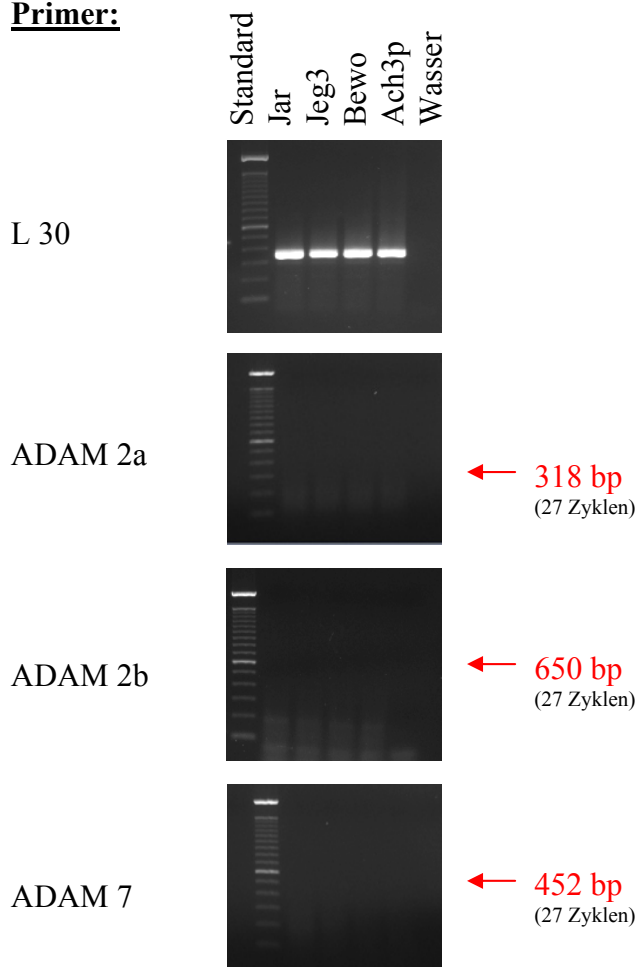
ADAM 2, 7, 11, 18, 29, 30, 33 ließen sich in keiner der vier Zelllinien nachweisen. Ebenso konnte im Falle der 147 bp Spleißvariante von ADAM 9b keine Amplifikation festgestellt werden. Das Primerpaar ADAM 10c zeigte ebenfalls keine spezifische Banden. Die bei ADAM 8b, 10b, 10c, 15b, 18a, 21b, 22a und 33b aufscheinenden Banden, die nicht mit den gesuchten Produktgrößen übereinstimmten, entsprachen auch nicht der Länge

genomischer Amplifikate und waren daher als unspezifisch anzusehen. Bei den Vertretern der ADAMTS-Familie ließen sich ADAMTS 2, 4, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 18 und 19 nicht nachweisen. Die bei ADAMTS 1a in allen Linien vorkommenden 344 bp Banden deckten sich mit der Größe genomischer Amplifikate und waren als solche anzunehmen. Gleiches galt für ADAMTS 13a. Im Falle von ADAMTS 10b und 13b waren die Banden als unspezifisch anzusehen. Unter den Vertreter der ADAMTS-like-Familie konnten in unseren Versuchen ADAMTSL 1 und 2 nicht nachgewiesen werden.

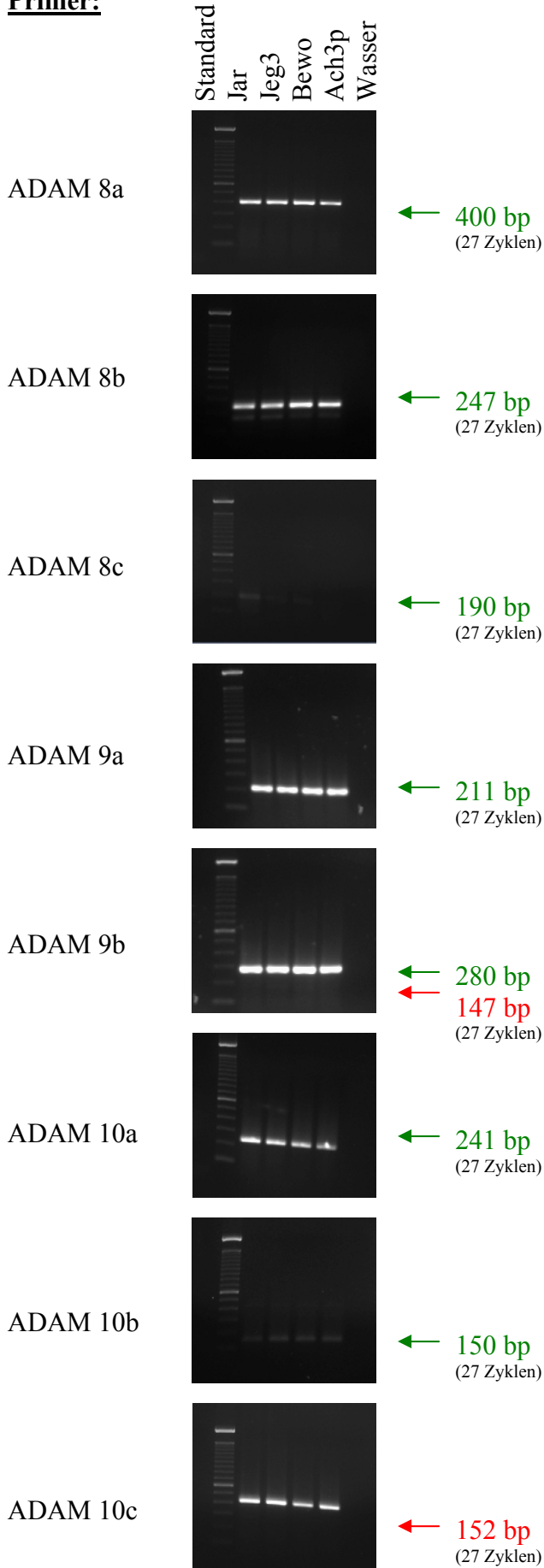
4.2.3 Gelfotos RT-PCR

Bei den im Folgenden dargestellten Gelfotos wurde die Expression der einzelnen Vertreter farbkodiert untermauert. Unter Angabe der erwarteten Produktlänge wurde das Aufscheinen spezifischer Banden mit einem Pfeil und der Farbe Grün markiert. Falls keine oder unspezifische Banden auftauchten, wurde die Stelle, an der das spezifische Produkt erwartet worden wäre, mit einem Pfeil und der rot markierten Produktlänge dargestellt.

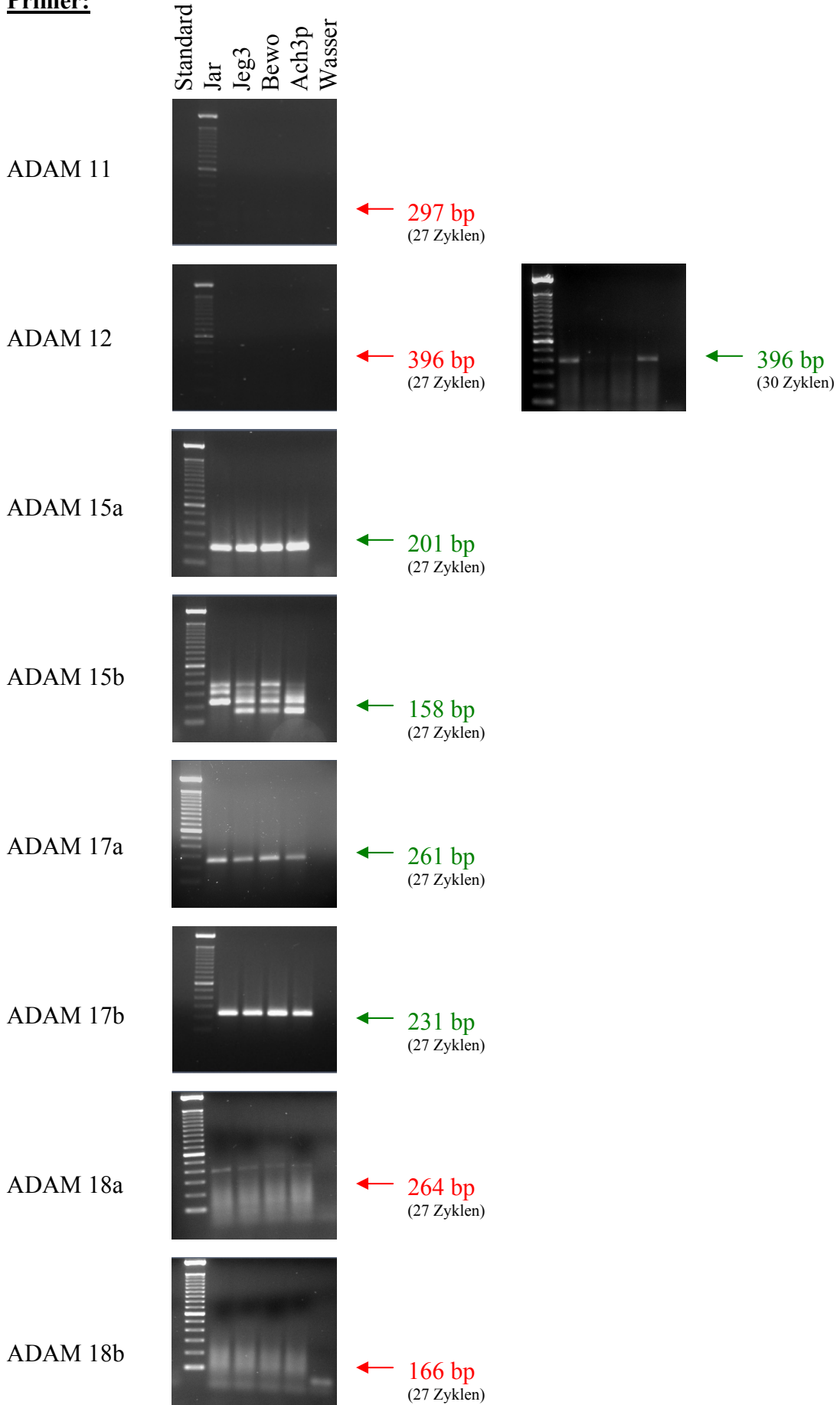
Primer:



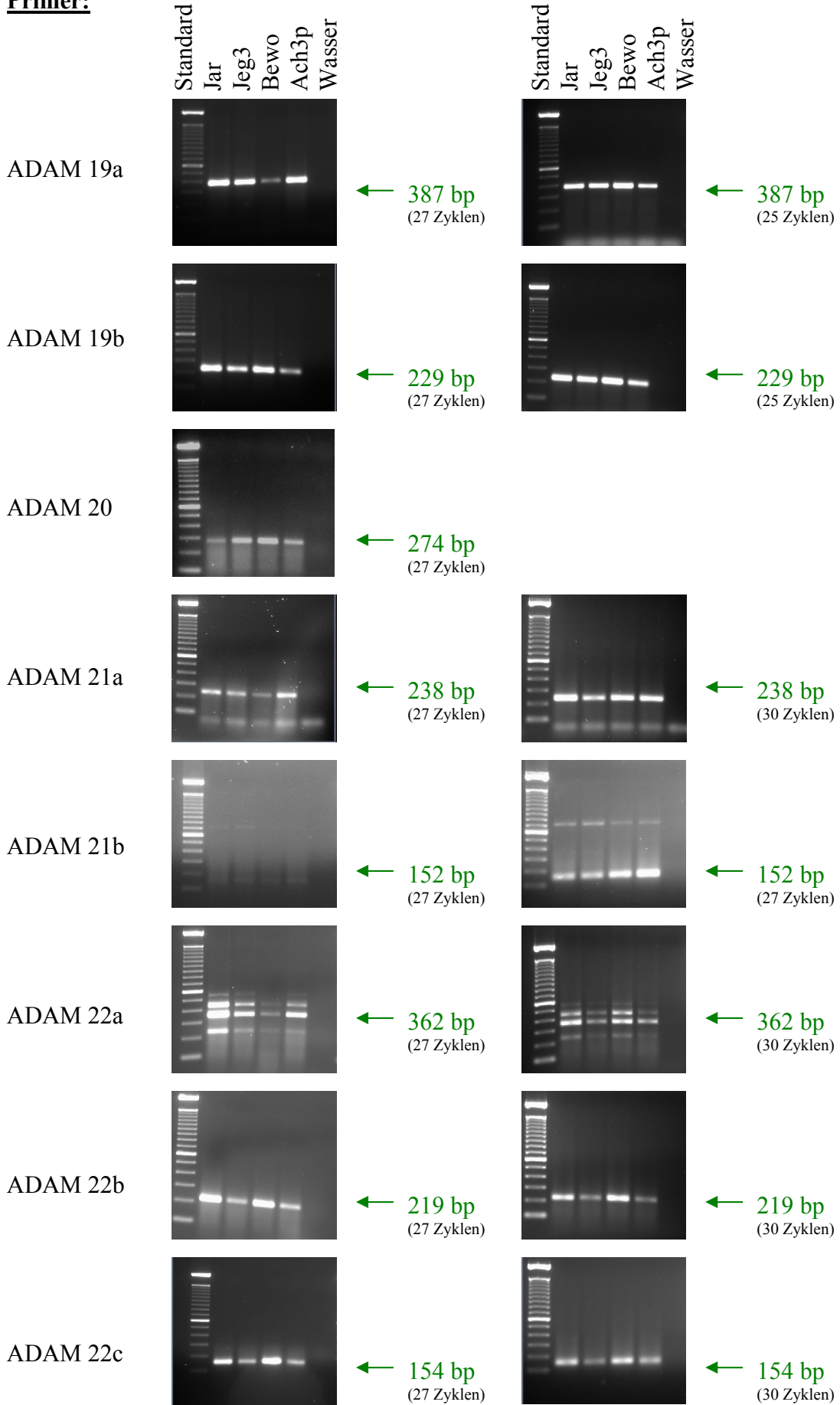
Primer:



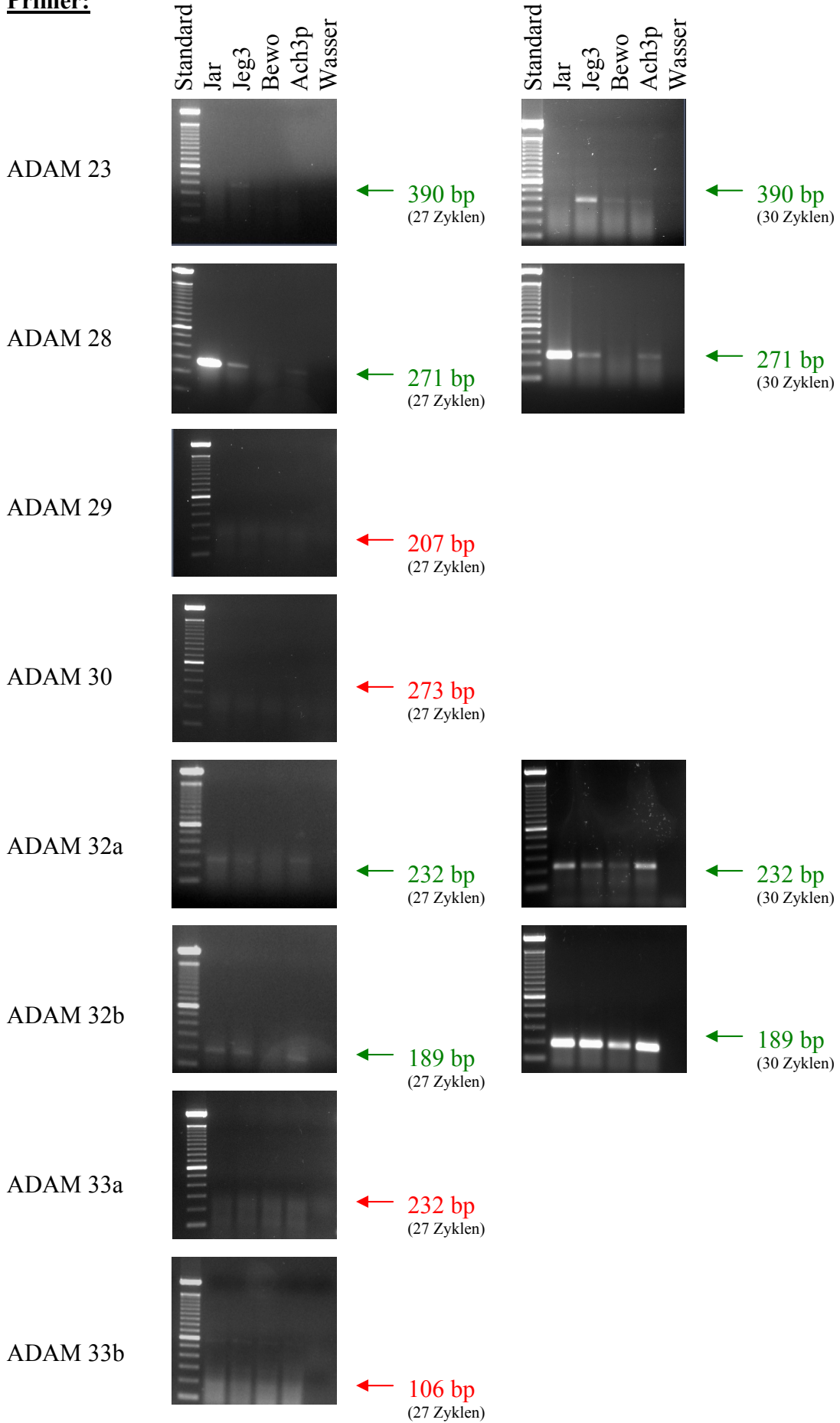
Primer:



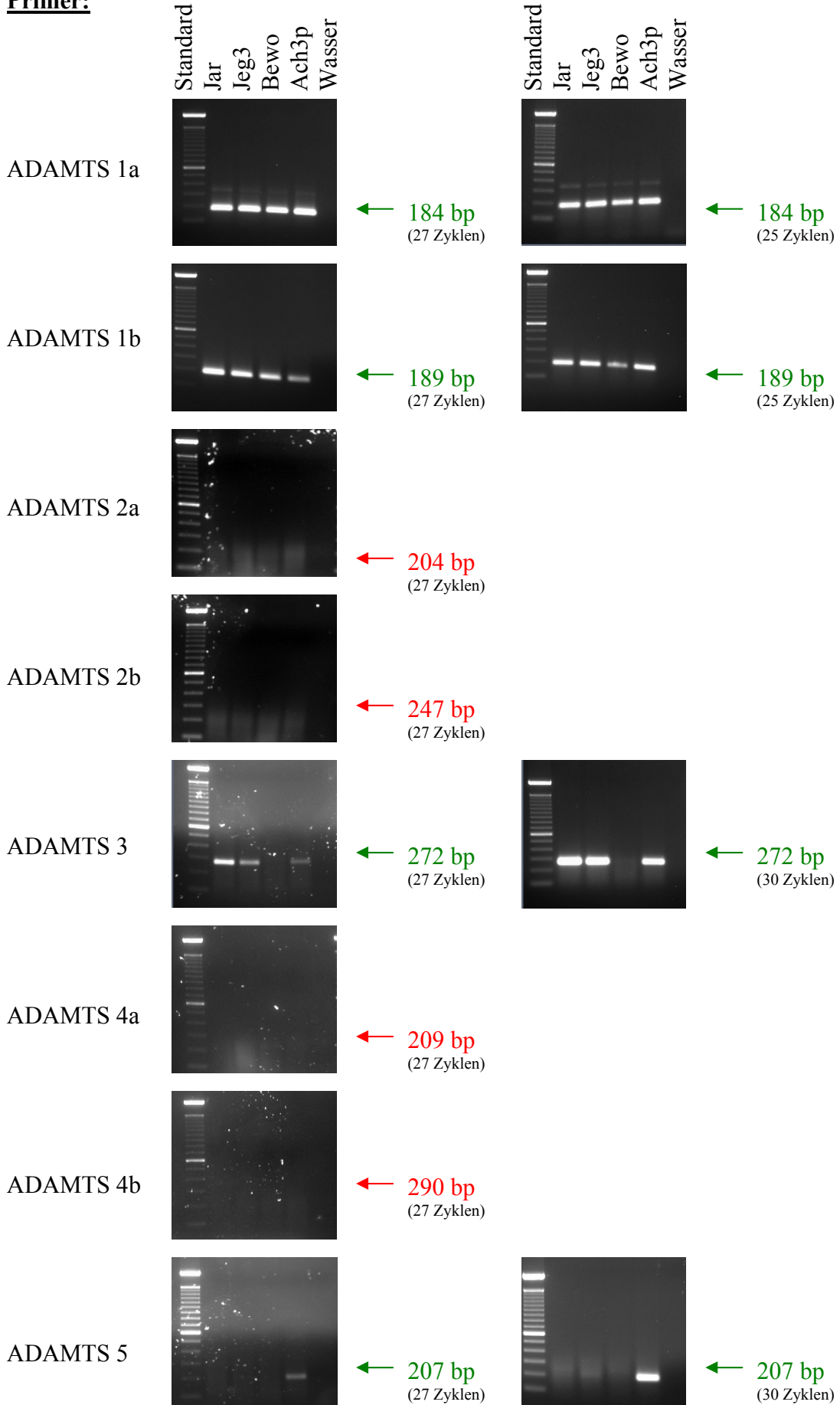
Primer:



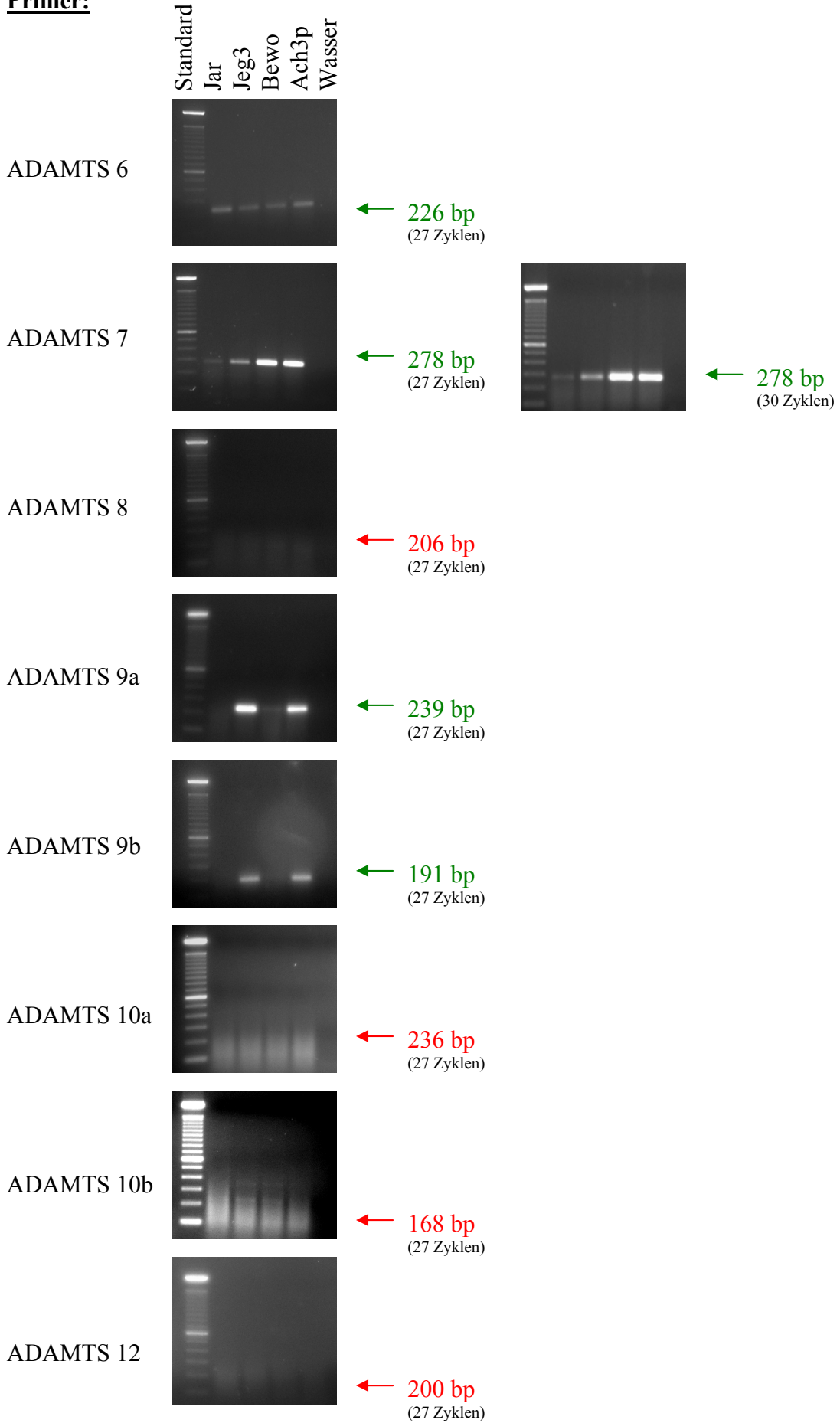
Primer:



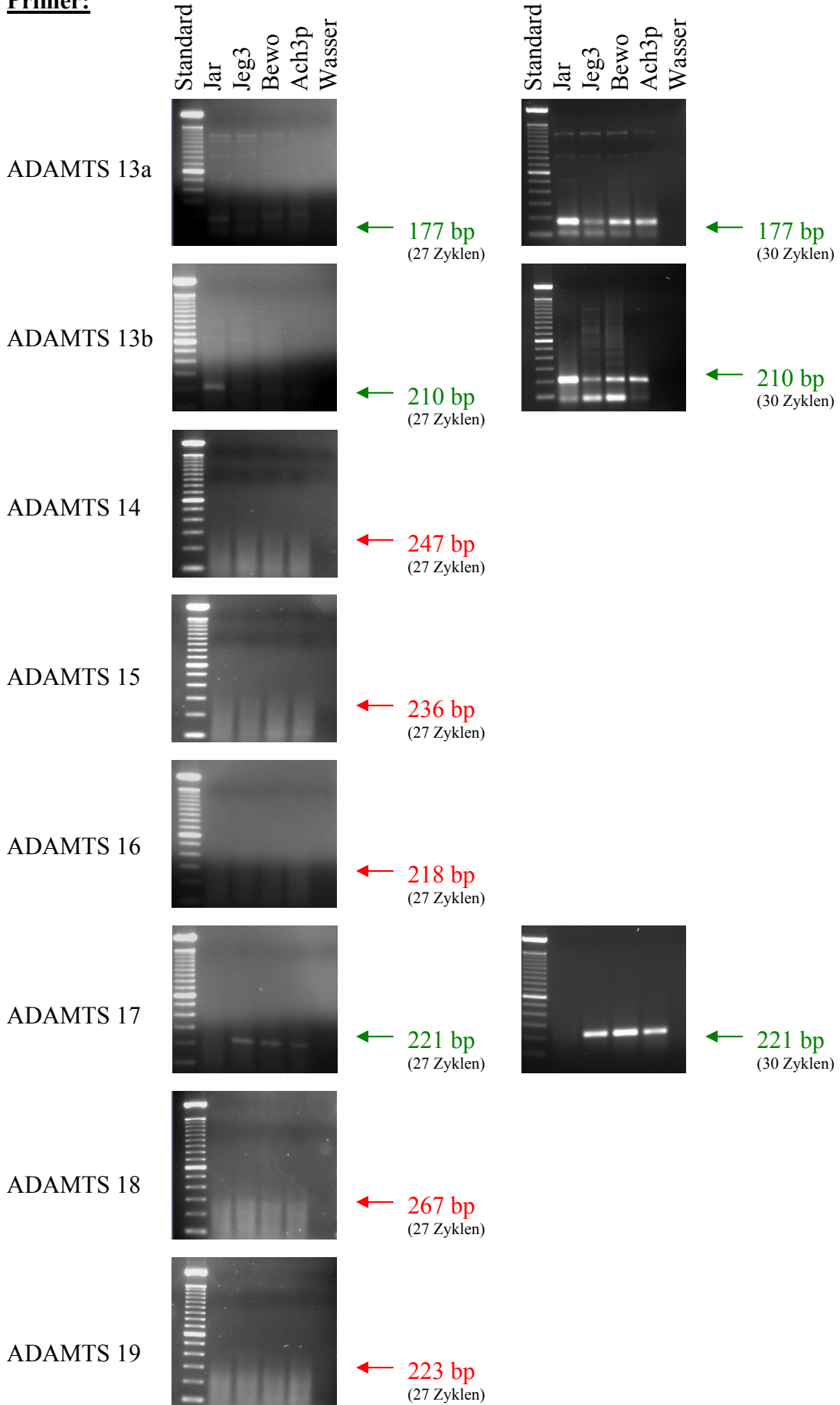
Primer:



Primer:



Primer:



Primer:

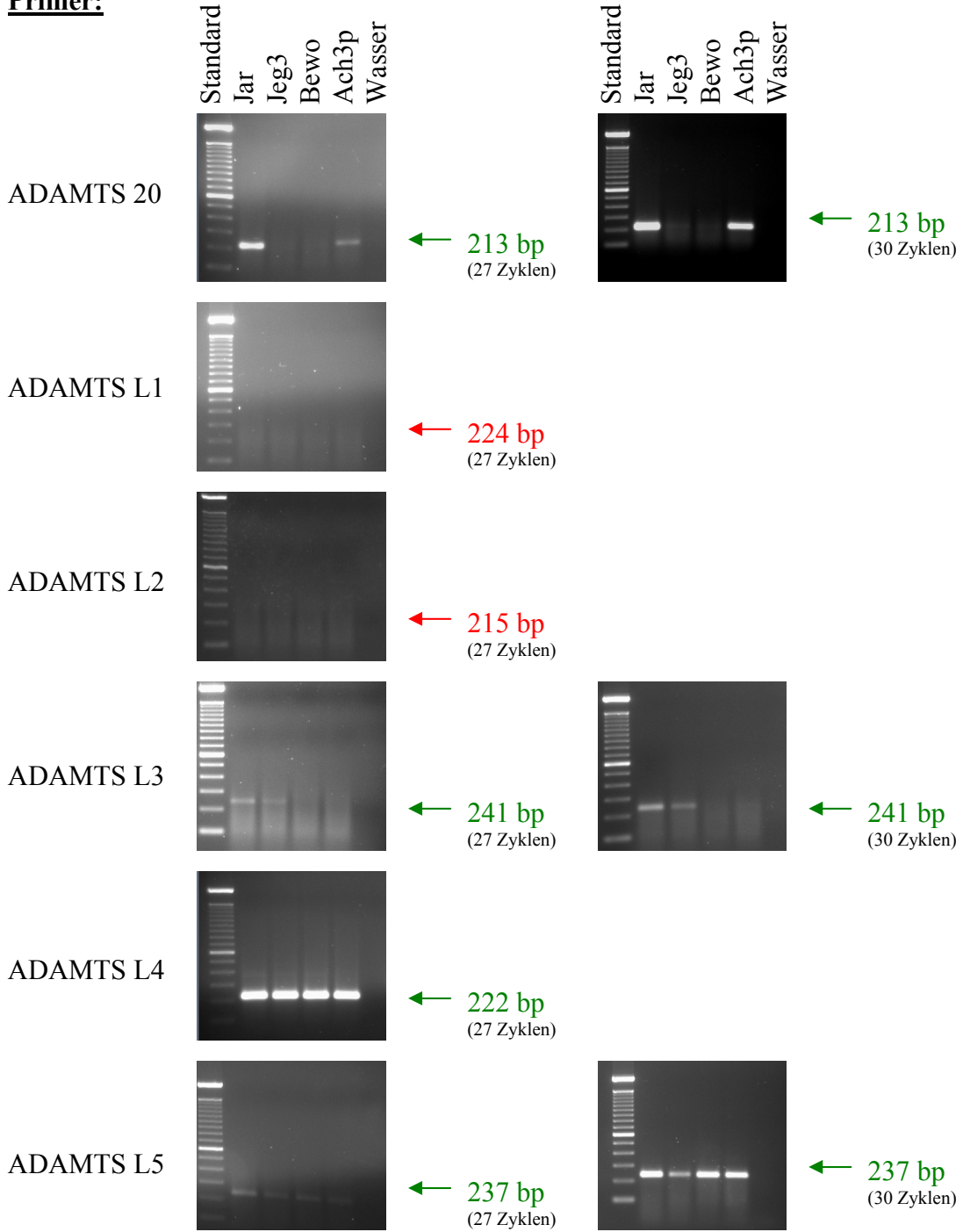


Tabelle 4-1 Übersicht nachgewiesene Vertreter RT-PCR

	Jar	Jeg3	Bewo	Ach3p
L 30	✓	✓	✓	✓
ADAM 2	∅	∅	∅	∅
ADAM 7	∅	∅	∅	∅
ADAM 8	✓	✓	✓	✓
ADAM 9	✓	✓	✓	✓
ADAM 10	✓	✓	✓	✓
ADAM 11	∅	∅	∅	∅
ADAM 12	✓	eventuell	sehr schwach	✓
ADAM 15	✓	✓	✓	✓
ADAM 17	✓	✓	✓	✓
ADAM 18	∅	∅	∅	∅
ADAM 19	✓	✓	✓	✓
ADAM 20	✓	✓	✓	✓
ADAM 21	✓	✓	✓	✓
ADAM 22	✓	✓	✓	✓
ADAM 23	∅	✓	sehr schwach	sehr schwach
ADAM 28	✓	✓	∅	✓
ADAM 29	∅	∅	∅	∅
ADAM 30	∅	∅	∅	∅
ADAM 32	✓	✓	✓	✓
ADAM 33	∅	∅	∅	∅
ADAMTS 1	✓	✓	✓	✓
ADAMTS 2	∅	∅	∅	∅
ADAMTS 3	✓	✓	∅	✓
ADAMTS 4	∅	∅	∅	∅
ADAMTS 5	∅	sehr schwach	∅	✓
ADAMTS 6	✓	✓	✓	✓
ADAMTS 7	✓	✓	✓	✓
ADAMTS 8	∅	∅	∅	∅
ADAMTS 9	∅	✓	sehr schwach	✓
ADAMTS 10	∅	∅	∅	∅
ADAMTS 12	∅	∅	∅	∅
ADAMTS 13	✓	✓	✓	✓
ADAMTS 14	∅	∅	∅	∅
ADAMTS 15	∅	∅	∅	∅
ADAMTS 16	∅	∅	∅	∅
ADAMTS 17	∅	✓	✓	✓
ADAMTS 18	∅	∅	∅	∅
ADAMTS 19	∅	∅	∅	∅
ADAMTS 20	✓	eventuell	∅	✓
ADAMTSL 1	∅	∅	∅	∅
ADAMTSL 2	∅	∅	∅	∅
ADAMTSL 3	✓	✓	∅	∅
ADAMTSL 4	✓	✓	✓	✓
ADAMTSL 5	✓	✓	✓	✓

4.3 Quantitative Realtime PCR

In der Literatur werden ADAM 28 und ADAMTS 5 wichtige Rollen bei der Tumorprogression zugeschrieben. Daher und aufgrund ihrer unterschiedlichen Expression in den von uns untersuchten Zelllinien schienen uns ADAM 28 und ADAMTS 5 für weitere Untersuchungen interessant. ADAM 28 scheint über die Spaltung von IGFBP-3 an der Carcinomprogression beteiligt zu sein (Mochizuki and Okada, 2007). In unseren Versuchen zeigte ADAM 28 in der zuvor durchgeführten RT-PCR eine sehr deutliche Bande in der Linie Jar und schwächere Banden in den miteinander verwandten Linien Jeg3 und Ach3p. Eine Bande in der Linie Bewo konnte nicht nachgewiesen werden. ADAMTS 5 schien aufgrund seiner starken Bande in der Linie Ach3p und einer sehr schwachen Bande in der „Mutterzelllinie“ von Ach3p der Linie Jeg3 untersuchenswert. In Jar und Bewo zeigten sich keine ADAMTS 5 Banden. In der Literatur wird seine Involvierung in die Glioblastominvasion beschrieben (Mochizuki and Okada, 2007). Aus diesen Gründen wurden beide Vertreter noch genauer hinsichtlich ihres quantitativen Vorkommens in den vier Chorioncarcinomlinien mittels quantitativer Realtime PCR untersucht. Diesmal wurde die PCR nicht per „one step“ Methode wie bei der RT-PCR, sondern in zwei Schritten durchgeführt. Zuerst wurde die gesamte mRNA jeder Linie mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit von Applied Biosystems nach Herstellerangabe in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde die cDNA Gen-spezifisch mittels iQ SYBR Green Supermix von Bio-Rad Laboratories nach Protokoll amplifiziert und mittels iCycler iQ-Software und Microsoft Excel ausgewertet. Quantifiziert wurde, wie in der Methodik beschrieben, relativ. Als Referenzgen diente L 30. Als Kalibrator der jeweils kleinste ΔC_t -Wert. Für die Erstellung von Balkendiagrammen wurden die Kehrwerte der kalibrierten ΔC_t -Werte verwendet, um einen direkten Zusammenhang zwischen RNA-Gehalt und Balkenhöhe darstellen zu können.

4.3.1 Referenzgen L 30

Für die relative Expressionsquantifizierung wurde von uns L 30 als Referenzgen herangezogen. Für eine korrekte Quantifizierung ist die gleichmäßige Expression des Referenzgens in allen Proben entscheidend. Das heißt, dass die L 30 Signalgraphen aller vier Zelllinien an gleicher Stelle den zuvor festgelegten Schwellenwert kreuzen und damit gleiche Ct-Werte liefern sollten.

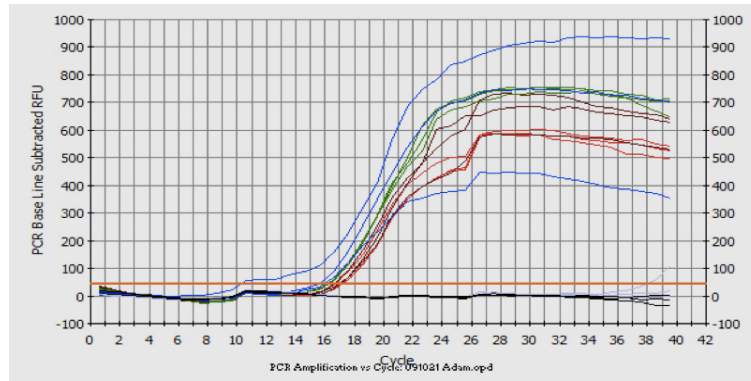


Abbildung 4.2 Lineardarstellung Realtime PCR L 30

Wie aus der Auswertung hervorging und in Abbildung 4.2 ersichtlich ist, schnitten die Graphen der vier Linien die Schwelle bei Ct-Werten zwischen 16,76 und 17,91. Im Falle einer Probe kam es zu einem sehr frühen Signalanstieg (blauer Graph ganz links). Dieser wurde als Ausreißer gewertet und daher für die folgenden Berechnungen vernachlässigt. Wie für den von uns verwendeten Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I nötig, wurden auch die Schmelzkurven ausgewertet.

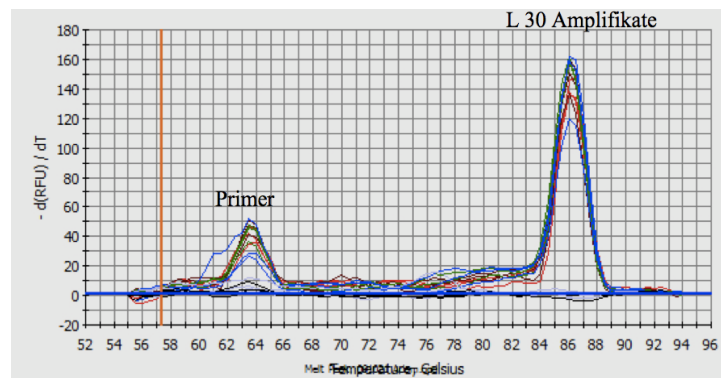


Abbildung 4.3 Schmelzkurve L 30 (1. Ableitung)

An den Schmelzkurven in Abbildung 4.3 ist zu erkennen, dass es bei unserem Versuch zu Primerdimeren gekommen war. Da diese in allen Zelllinien relativ gleichmäßig und mit moderater Signalamplitude vorkamen, wurde dieser Sachverhalt vernachlässigt. Dieser Sachverhalt galt auch für ADAM 28 und ADAMTS 5.

4.3.2 Effizienzbeurteilung

Für die relative Quantifizierung eines Gens sollten die PCR Effizienzen des zu untersuchenden Gens und des Referenzgens gleich sein. Überprüfen lässt sich dies, indem

man eine Verdünnungsreihe der RNA oder cDNA anlegt und nach Amplifikation die Ct-Werte gegen die eingesetzten Konzentrationen gegeneinander graphisch aufträgt. Hier sollten die Graphen des untersuchten Gens und des Referenzgens parallel verlaufen.

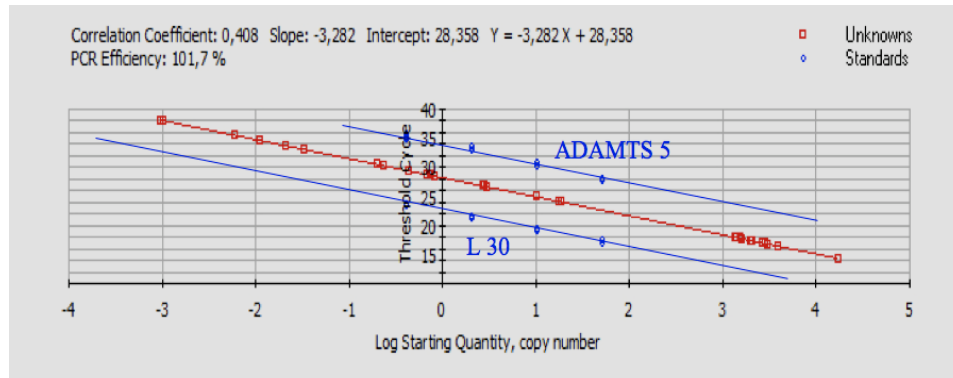


Abbildung 4.4 cDNA-Standardkurven ADAMTS 5 und L 30

Wie sich in der Abbildung 4.4 zeigt, verliefen die cDNA-Standardkurven, die aus dem RNA-Pool der vier Zelllinien und mit Primern für ADAMTS 5 und L 30 erstellt wurden, parallel. Dies sprach für gleichen Effizienzen während der PCR. Beim Einsatz verschiedener mRNA-Mengen blieb also das Verhältnis zwischen ADAMTS 5 und L 30 gleich. Vorausgesetzt waren hier natürlich gleiche Effizienzen bei der Reversen Transkription, wie sie bei dem von uns verwendeten Kit vom Hersteller propagiert werden. Ein Effizienzvergleich zwischen ADAM 28 und L 30 fand nicht statt.

4.3.3 ADAM 28

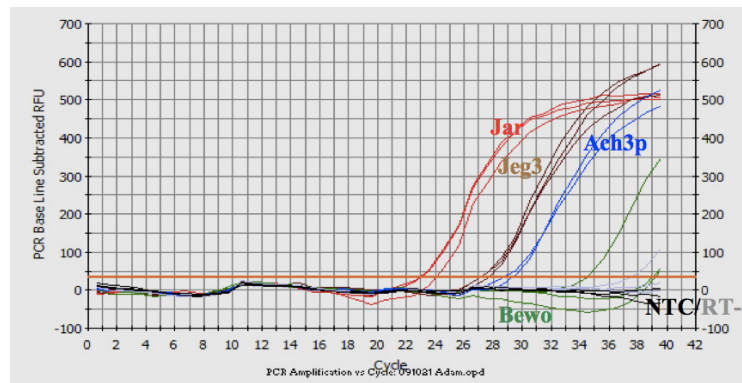


Abbildung 4.5 Lineardarstellung Realtime PCR ADAM 28

Wie Abbildung 4.5 zeigt, war die Expression von ADAM 28 in der Linie Jar am stärksten, gefolgt von der Linie Jeg3 und Ach3p. Wie in der RT-PCR zuvor konnte ADAM 28 in der Linie Bewo von uns nicht nachgewiesen werden. Das späte Kreuzen der Bewo-Graphen nach Zyklus 39 wurde als unspezifisch gewertet. Derjenige Graph der Linie Bewo, der knapp vor Zyklus 35 den Schwellenwert kreuzte, wurde im Vergleich zu den beiden übrigen Bewo-Graphen als Ausreißer betrachtet. Daher fanden die Ct-Werte der Linie Bewo auch für die weiteren Berechnungen keine Berücksichtigung.

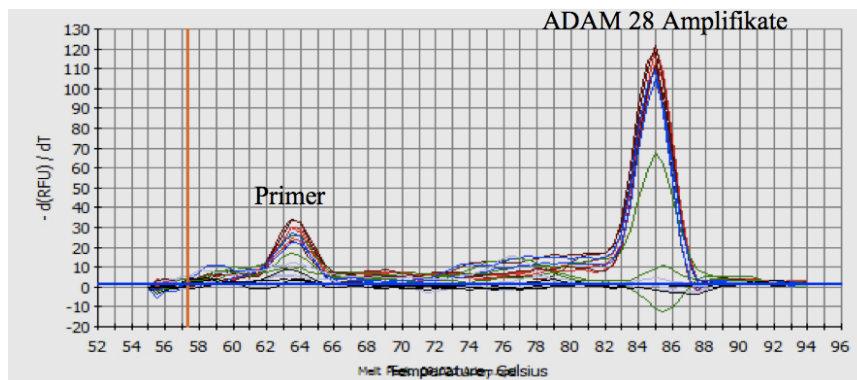


Abbildung 4.6 Schmelzkurve ADAM 28 (1. Ableitung)

An den Schmelzkurven von ADAM 28 in Abbildung 4.6 ist zu erkennen, dass Primerdimere vorlagen. Wie schon bei L 30 beschrieben, war dies jedoch zu vernachlässigen.

Tabelle 4-2 Ct-Wertetabelle ADAM 28, L 30

	Ct-Mittelwerte		Δ Ct	/6,3	Kehrwert
	ADAM 28	L 30			
Jar	24,21	17,91	6,3	1	1
Jeg3	28,77	17,77	11	1,75	0,57
Bewo	-	17,1	-	-	-
Ach3p	30,53	16,76	13,77	2,19	0,46

Wie Tabelle 4.2 zeigt, wurden jeweils Ct-Mittelwerte gebildet. Mittels Δ Ct-Methode (Mittelwert Zielgen – Mittelwert Referenzgen) wurde anschließend auf das Referenzgen L 30 normalisiert. Da die Linie Jar den kleinsten Δ Ct-Wert besaß, fungierte sie als Kalibrator. Das heißt, dass alle Δ Ct-Werte durch 6,3 geteilt wurden. Das quantitative Vorkommen von mRNA in den einzelnen Linien (kalibrierte Δ Ct-Werte) ist nun im Vergleich zum kalibrierten Wert des Kalibrators selbst (=1) zu interpretieren. Man muss hier berücksichtigen, dass diese Werte mit dem mRNA-Gehalt indirekt proportional korrelieren. Aus diesem Grund wurden für die graphische Darstellung mittels Balkendiagrammen noch die Kehrwerte gebildet (1/kalibrierter Δ Ct-Wert), um direkte Proportionalitäten herzustellen.

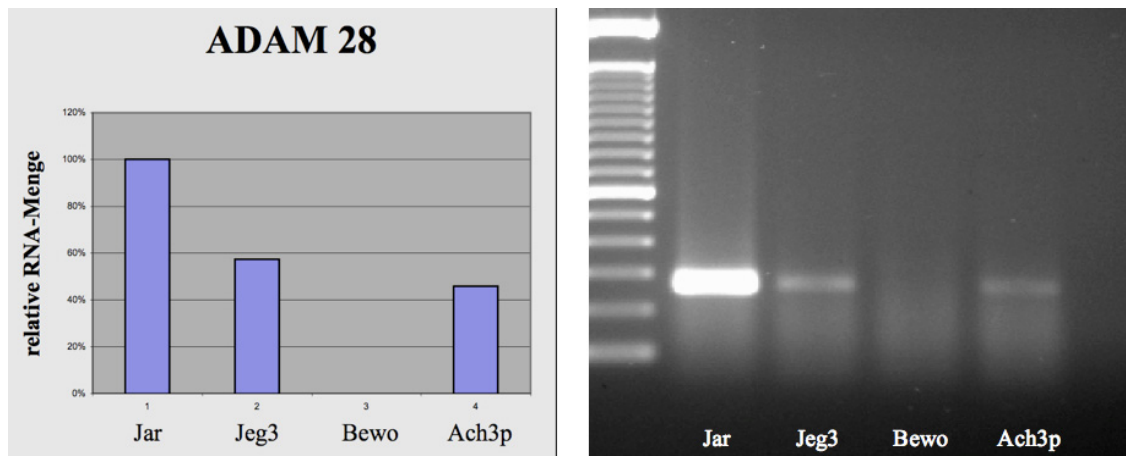


Abbildung 4.7 Quantitative und semiquantitative Darstellung ADAM 28

Wie in Abbildung 4.7 ersichtlich ist, korrelieren die Ergebnisse der Realtime PCR gut mit denen der RT-PCR. Es bestätigte sich die semiquantitative Annahme, dass ADAM 28 die stärkste Expression in der Linie Jar zeigt, gefolgt von der Linie Jeg3 und deren „Tochterlinie“ Ach3p. Eine Expression in der Linie Bewo konnte wiederum nicht

festgestellt werden. Nochmals sei darauf hingewiesen, dass die im Diagramm abgebildeten Balken der Linien Jeg3 und Ach3p nur relativ zur Balkenhöhe der Linie Jar zu sehen sind, dem sog. Kalibrator.

4.3.4 ADAMTS 5

Die Auswertung von ADAMTS 5 erfolgte nach den gleichen Regeln wie für ADAM 28 beschrieben.

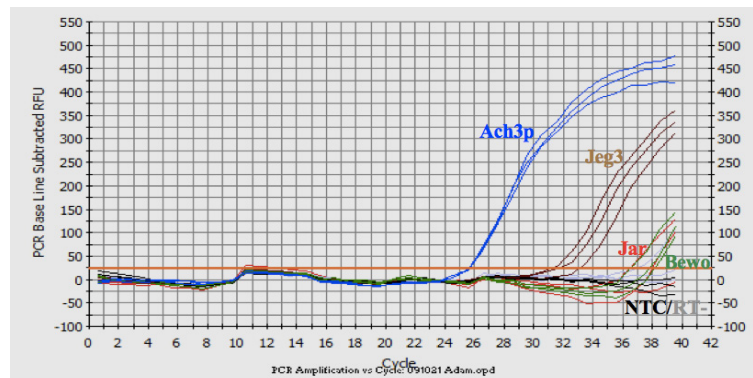


Abbildung 4.8 Lineardarstellung Realtime PCR ADAMTS 5

Wie in Abbildung 4.8 gezeigt, konnte für ADAMTS 5 in der Zelllinie Ach3p die stärkste Expression nachgewiesen werden. Ebenfalls konnte in der „Mutterlinie“ Jeg3 die Expression von ADAMTS 5 verzeichnet werden. Jedoch kreuzte hier der Signalgraph wesentlich später, was für einen geringeren mRNA-Gehalt in dieser Linie spricht. Wie schon in der RT-PCR zuvor war ein Expressionsnachweis von ADAMTS 5 in den Linien Jar und Bewo nicht möglich. Diejenigen Graphen dieser beiden Linien, die erst spät bei ca. Zyklus 37/38 kreuzten, wurden als unspezifisch angesehen und für die weiteren Berechnungen nicht gewertet. Unterstützt wurde dieser Sachverhalt auch durch die Analyse der Schmelzkurven.

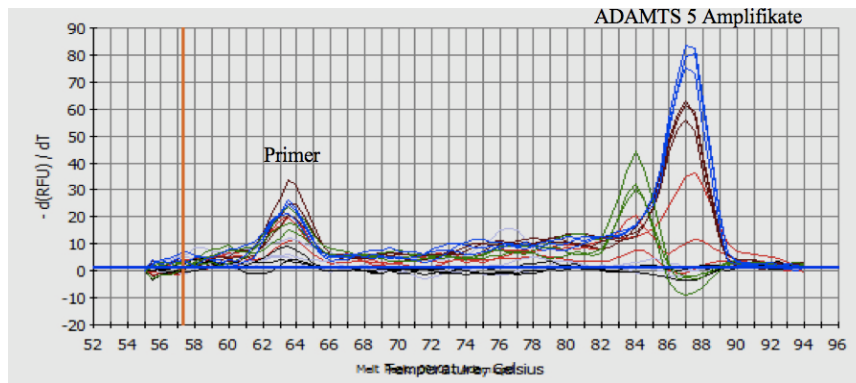


Abbildung 4.9 Schmelzkurve ADAMTS 5 (1. Ableitung)

Die in Abbildung 4.9 auftretenden Primerdimere und die aus der Reihe fallenden Bewo-Amplifikate, die ein anderes Schmelzverhalten als die Produkte der Linien Ach3p und Jeg3 zeigten, stützten die Annahme, dass es sich um Signalgraphen unspezifischer Amplifikate handelte. Da für die Linie Jar und Bewo aufgrund der Höhe ihrer Ct-Werte angenommen wurde, dass im Falle von ADAMTS 5 keine mRNA vorlag, wurden wiederum keine Δ Ct-Werte errechnet.

Tabelle 4-3 Ct-Wertetabelle ADAMTS 5, L30

	Ct-Mittelwerte		Δ Ct	/10,14	Kehrwert
	ADAMTS 5	L 30			
Jar	-	17,91	-	-	-
Jeg3	33,53	17,77	15,76	1,55	0,64
Bewo	-	17,1	-	-	-
Ach3p	26,9	16,76	10,14	1	1

Tabelle 4.3 zeigt, dass die Linie Ach3p den kleinsten Δ Ct-Wert besaß und deshalb als Kalibrator verwendet wurde.

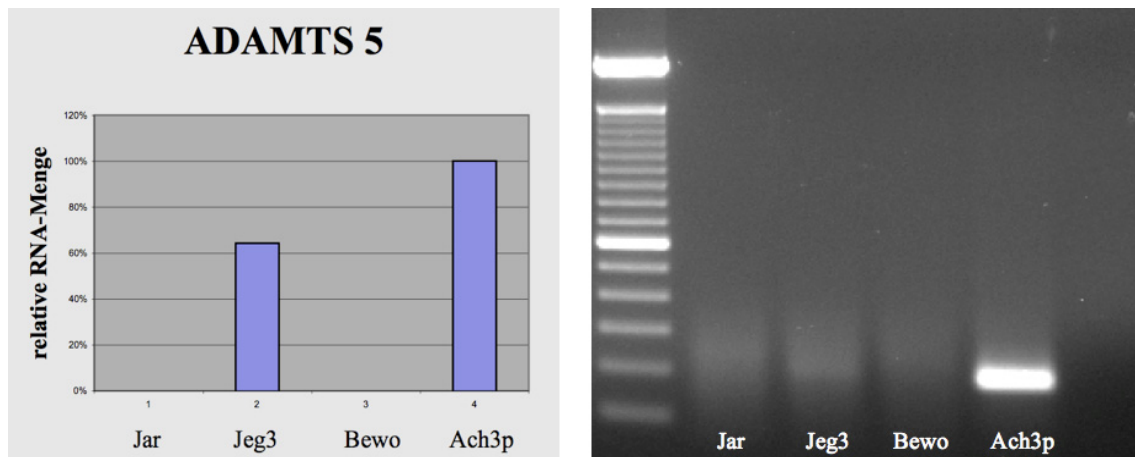


Abbildung 4.10 Quantitative und semiquantitative Darstellung ADAMTS 5

Wie aus Abbildung 4.10 hervorgeht, korrelierten auch im Falle von ADAMTS 5 die Ergebnisse der RT-PCR und der Realtime PCR wieder miteinander. Es gelang folglich der Nachweis von ADAMTS 5 in den Linien Ach3p und Jeg3, wobei wieder eine stärkere Expression in der Linie Ach3p zu verzeichnen war. Ein Nachweis in den Linien Jar und Bewo war wiederum nicht möglich. Trotz Korrelation bleibt jedoch einzuräumen, dass, während der RNA-Gehalt von Jeg3 im Balkendiagramm ca. 60 % des Gehaltes von Ach3p beträgt, die Bandenstärken von Jeg3 und Ach3p nicht in diesem Verhältnis zusammenhängen. Hier ist die Jeg3-Bande fast nur zu erraten. Da die RT-PCR nur semiquantitativen Charakter besitzt, ist hier den Ergebnissen des Realtime-Verfahrens der Vorzug zu geben.

4.4 Immunfluoreszenz

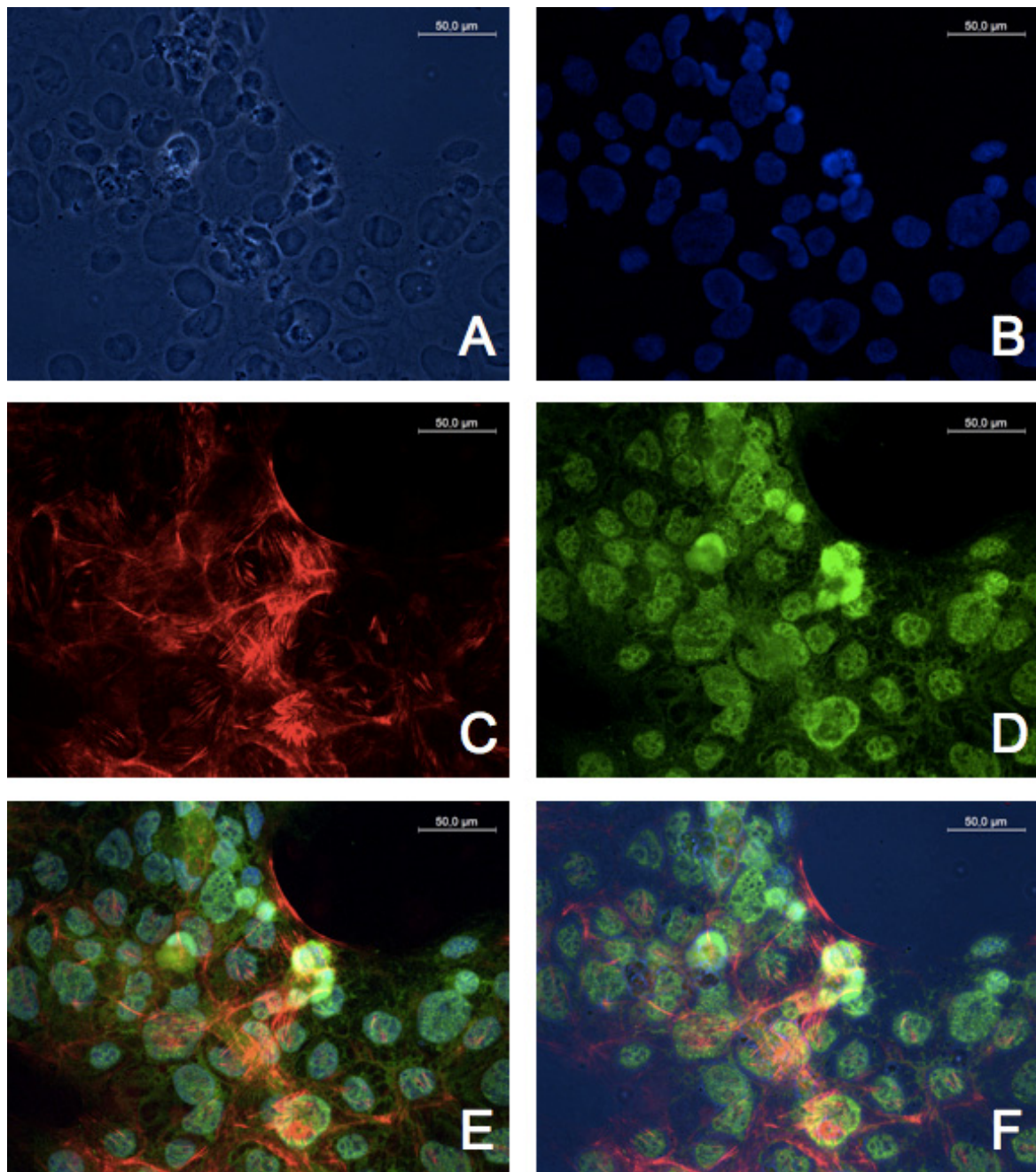


Abbildung 4.11 Fluoreszenzaufnahmen Ach3p zur Übersicht (400x)

(A) Nativaufnahme im Phasenkontrast (B) Kerndarstellung mittels DAPI-Färbung (C) Zytoskelfärbung mit Rhodamine Phalloidin (D) Färbung gegen ADAMTS 5 (E) Bildüberlagerung der DAPI-, Rhodamine Phalloidin- und Anti-ADAMTS 5-Färbung (F) Bildüberlagerung der DAPI-, Rhodamine Phalloidin-, Anti-ADAMTS 5-Färbung und der Phasenkontrastaufnahme

Zum Schluss unserer Untersuchungen wurden noch Immunfluoreszenzfärbungen gegen ADAMTS 5 in der Zelllinie Ach3p durchgeführt, wie sie in Abbildung 4.11 exemplarisch dargestellt sind. Nach der sterilen Anzucht der Zellen auf Glasobjektträgern und deren „Ernte“, wurden sie zur Darstellung von ADAMTS 5 mit polyklonalen Primärantikörpern

der Firma Affinity BioReagents und dem polyklonalen Sekundärantikörper DyLight 488 der Firma Jackson ImmunoResearch inkubiert. Zudem wurden die Aktinfasern des Zytoskeletts mit Rhodamine Phalloidin der Firma Biotium und der Zellkern mit DAPI gefärbt. Beim anschließenden Mikroskopieren der Zellen mit einer Belichtungszeit von 200 ms zeigten sich drei verschiedene Fluoreszenzentitäten. Der größte Teil der Zellen zeigte ein eher homogenes Verteilungsmuster des Fluoreszenzsignals, mit einer deutlichen Signalverdichtung im Bereich des Zellkerns. Oft erschien das Fluoreszenzsignal einen zusätzlichen lamellären bis retikulären Aspekt zu besitzen. Dieser Typ lag geschätzt in etwa 80-90 % der Fälle vor (siehe Abbildung 4.11, 4.12 und 4.13). In den restlichen 10-20 % der Fälle präsentierten sich granuläre Fluoreszenzsignale, die entweder im Bereich des Zellkerns vorkamen und dort sehr deutlich erschienen (siehe Abbildung 4.14) oder im Zytoplasma verteilt auftraten (siehe Abbildung 4.15). Die Negativkontrollen, die auf jedem Objektträger mitliefen und im Unterschied zu den zu untersuchenden Proben nicht mit Primärantikörper inkubiert wurden, zeigten bei einer Belichtungszeit von 200 ms kein optisch erfassbares Fluoreszenzsignal (siehe Abbildung 4.16).

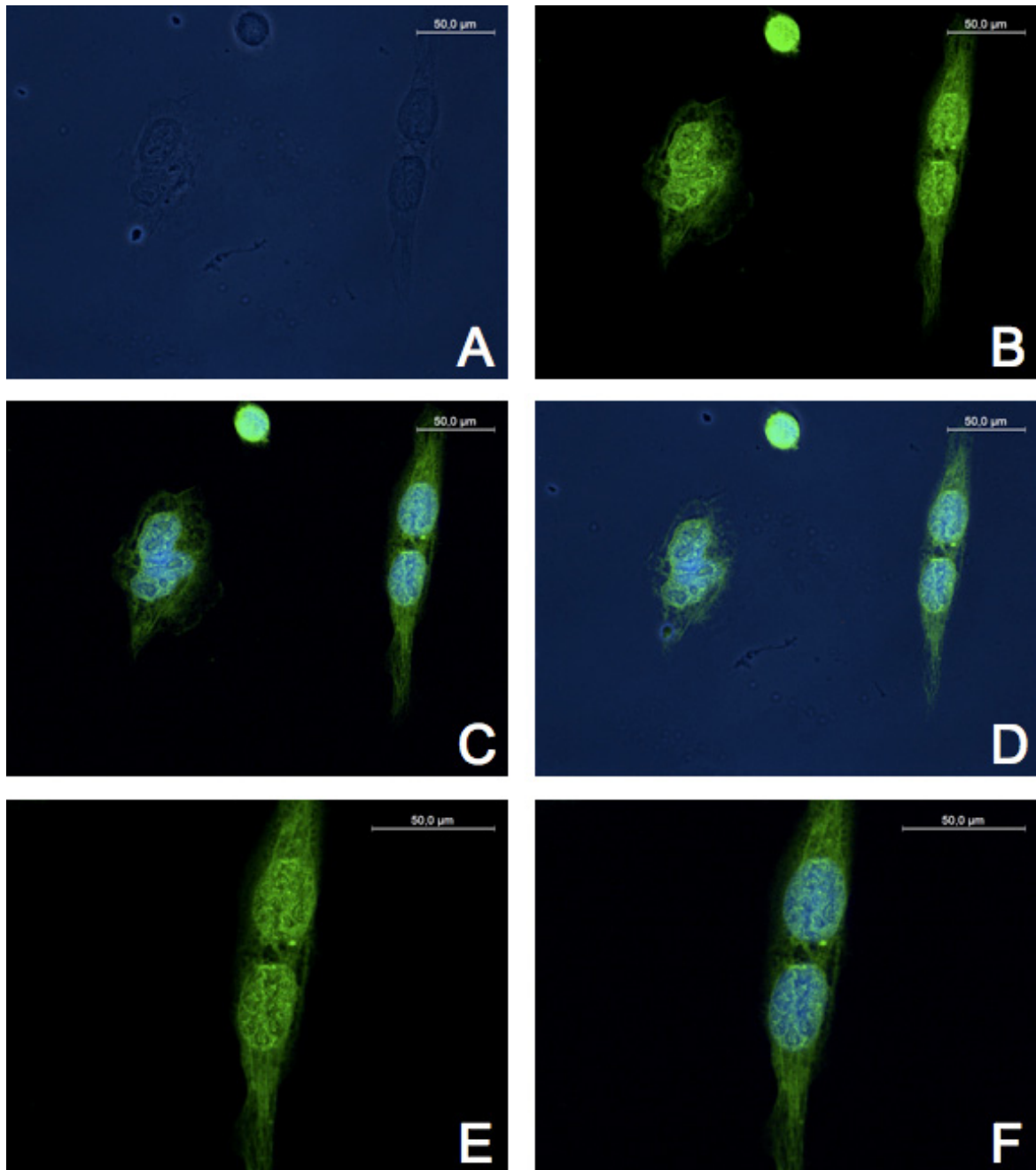


Abbildung 4.12 Homogen bis lamellär retikulärer Fluoreszenztyp

(A) Nativaufnahme im Phasenkontrast (400x) (B) Färbung gegen ADAMTS 5 (400x) (C) Bildüberlagerung der DAPI- und Anti-ADAMTS 5-Färbung (400x) (D) Bildüberlagerung der DAPI- und Anti-ADAMTS 5-Färbung sowie der Phasenkontrastaufnahme (400x) (E) Färbung gegen ADAMTS 5 (630x) (F) Bildüberlagerung der DAPI- und Anti-ADAMTS 5-Färbung (630x)

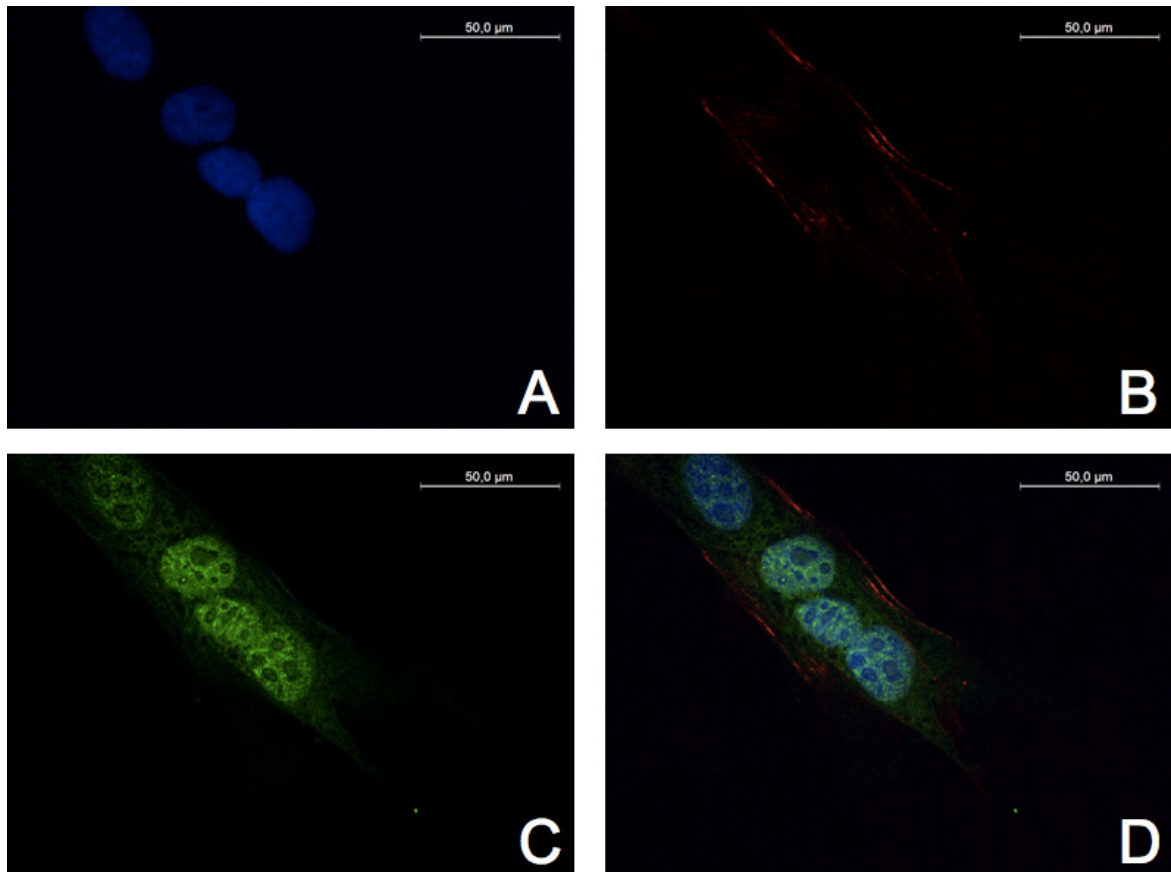


Abbildung 4.13 Homogen bis lamellär retikulärer Fluoreszenztyp (630x)

(A) Kerndarstellung mittels DAPI-Färbung (B) Zytoskelettfärbung mit Rhodamine Phalloidin (C) Färbung gegen ADAMTS 5 (D) Bildüberlagerung der DAPI-, Rhodamine Phalloidin- und Anti-ADAMTS 5-Färbung

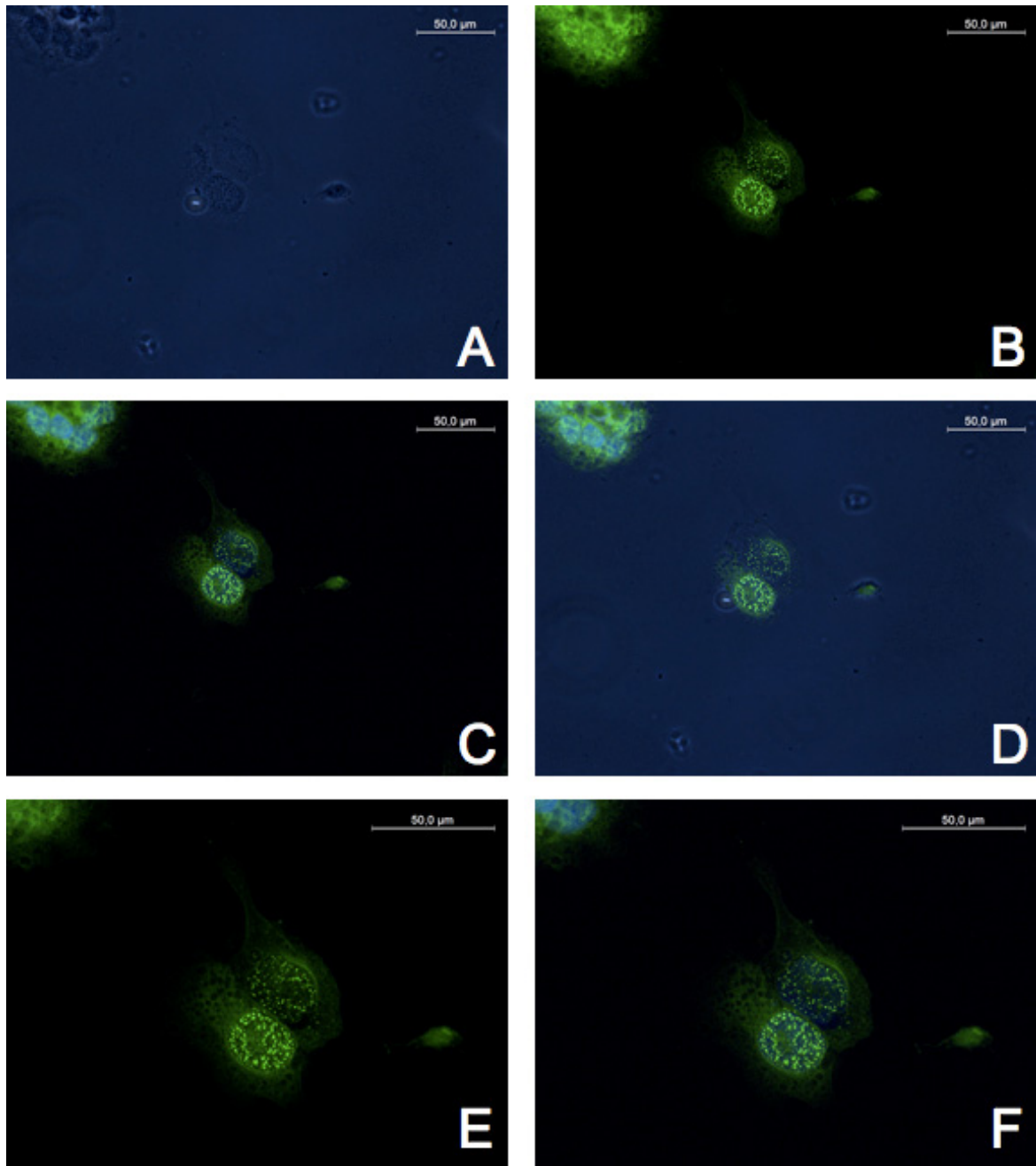


Abbildung 4.14 Nukleär granulärer Fluoreszenztyp

(A) Nativaufnahme im Phasenkontrast (400x) (B) Färbung gegen ADAMTS 5 (400x) (C) Bildüberlagerung der DAPI- und Anti-ADAMTS 5-Färbung (400x) (D) Bildüberlagerung der DAPI- und Anti-ADAMTS 5-Färbung sowie der Phasenkontrastaufnahme (400x) (E) Färbung gegen ADAMTS 5 (630x) (F) Bildüberlagerung der DAPI- und Anti-ADAMTS 5-Färbung (630x)

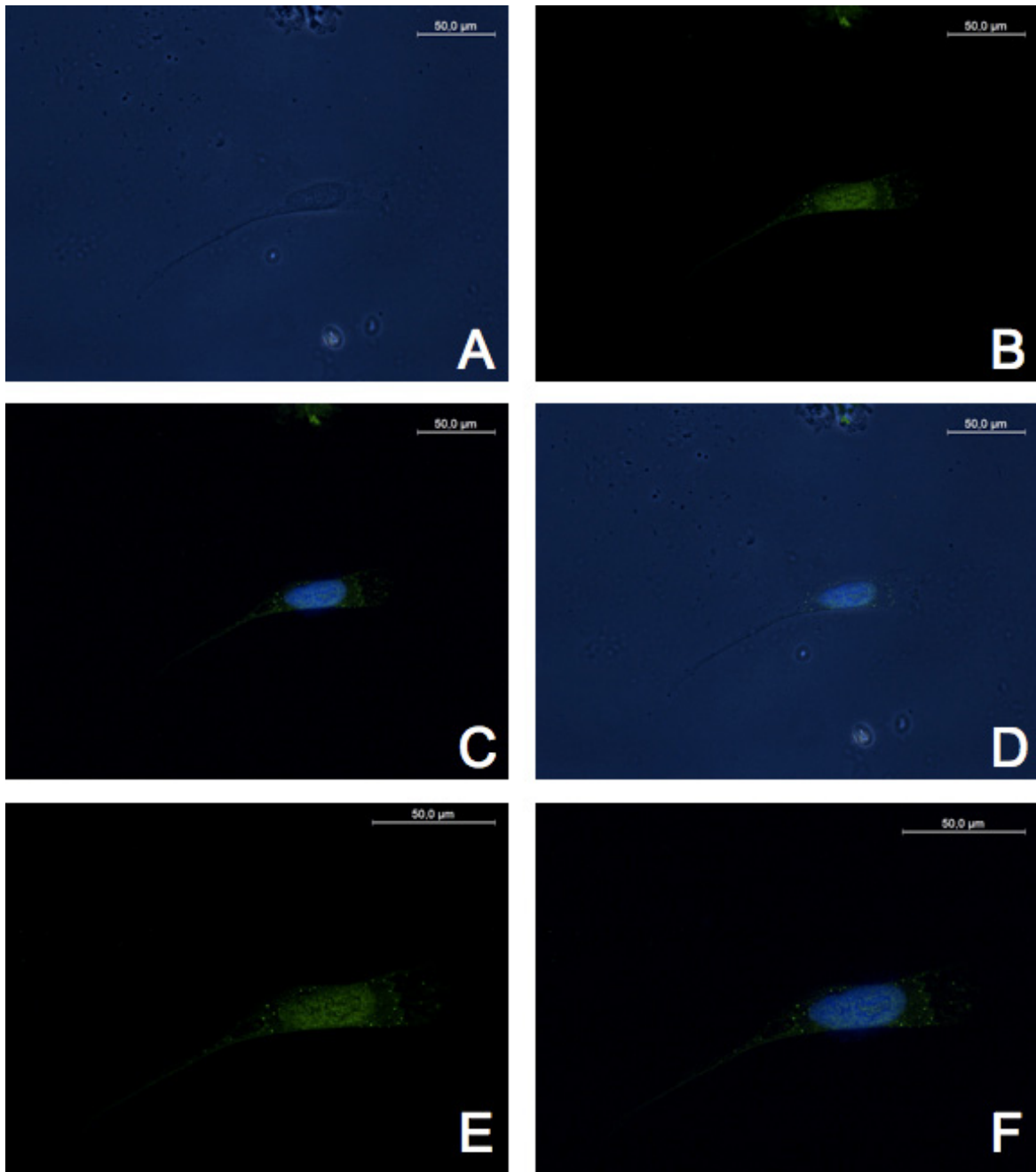


Abbildung 4.15 Zytoplasmatisch granulärer Fluoreszenztyp

(A) Nativaufnahme im Phasenkontrast (400x) (B) Färbung gegen ADAMTS 5 (400x) (C) Bildüberlagerung der DAPI- und Anti-ADAMTS 5-Färbung (400x) (D) Bildüberlagerung der DAPI- und Anti-ADAMTS 5-Färbung und der Phasenkontrastaufnahme (400x) (E) Färbung gegen ADAMTS 5 (630x) (F) Bildüberlagerung der DAPI- und Anti-ADAMTS 5-Färbung (630x)

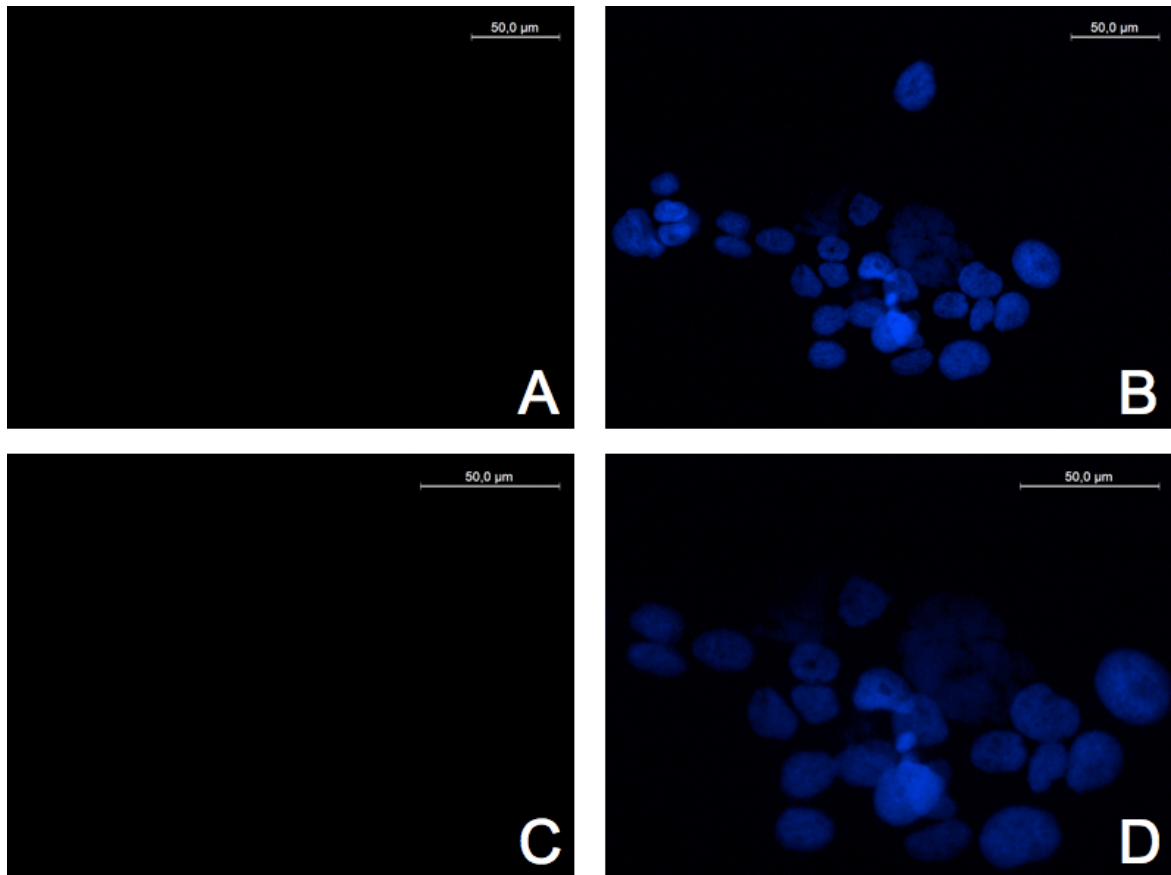


Abbildung 4.16 Negativkontrolle bei 200 ms Belichtungszeit

(A) Färbung gegen ADAMTS 5 (400x) (B) Bildüberlagerung der DAPI- und Anti-ADAMTS 5-Färbung (400x) (C) Färbung gegen ADAMTS 5 (630x) (D) Bildüberlagerung der DAPI- und Anti-ADAMTS 5-Färbung (630x)

5 Diskussion

Die Rolle der noch relativ jungen ADAM- und ADAMTS-Vertreter bei der Tumorentstehung und –progression wird seit ein paar Jahren immer evidenter. Ziel unserer Arbeit war es, ein Expressionsprofil dieser Proteine in den vier Chorioncarcinomlinien Jar, Jeg3, Bewo und Ach3p zu erstellen. Mittels RT-PCR konnten wir zeigen, dass auf mRNA-Ebene ADAM 8, 9, 10, 12, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 28, 32 sowie ADAMTS 1, 3, 5, 6, 7, 9, 13, 17, 20 als auch ADAMTSL 3, 4 und 5 exprimiert wurden. Hierbei konnten ADAM 8, 9, 10, 15, 17, 19, 21, ADAMTS 1, 6 und ADAMTSL 4 gleichmäßig in allen Linien nachgewiesen werden, während die übrigen Vertreter entweder nicht in allen Linien oder mit unterschiedlichen Bandenintensitäten vorkamen. Mit Ausnahme von ADAM 11 und ADAMTS 4 konnten wir eine Expression aller Vertreter, die derzeit in der Literatur mit Tumoren in Verbindung gebracht werden, finden. Dies waren ADAM 8, 9, 10, 12, 15, 17, 19 und 28 sowie ADAMTS 1 und 5. Auch wenn es in der Literatur viele Hinweise auf das ursächliche Vorkommen der genannten Mitglieder in Tumoren gibt, fehlen doch zumeist verlässliche funktionelle Untersuchungen hinsichtlich der genauen Rolle der einzelnen Vertreter, sodass definitive Bewertungen hinsichtlich der Wertigkeit einzelner Vertreter noch nicht getroffen werden können (Mochizuki and Okada, 2007). Im Hinblick auf eine Rolle im Tumorgeschehen zeichnen sich interessanterweise im Moment diejenigen ADAMs ab, von denen eine Funktion als Protease bekannt ist, wenngleich auch andere Domänen der ADAMs im Bezug auf Proliferation und Migration theoretisch von Bedeutung sein könnten (Murphy, 2008). Im Nachfolgenden werden diejenigen Vertreter nochmals dargestellt, denen eine Rolle im Tumorgeschehen zugesprochen wird und die wir, bis auf die zwei genannten Ausnahmen, alle nachweisen konnten:

ADAM 8:

ADAM 8 wird eine physiologische Rolle als Sheddase bei immunologischen Prozessen, der Osteoklastendifferenzierung sowie der Gehirnfunktion zugesprochen. Seine Überexpression konnte in Astrozytomen sowie Lungen-, Pankreas- und Nierencarcinomen nachgewiesen werden. Aus Transfektionsexperimenten ist bekannt, dass es eine proinvasive Wirkung auf Tumorzellen besitzt (Mochizuki and Okada, 2007; Murphy, 2008). Wir konnten seine Expression in allen vier Linien mit einer gleichmäßigen Bandenintensität zeigen.

ADAM 9:

ADAM 9 scheint vor allem beim shedding des heparin binding epidermal growth factors (HB-EGF) sowie beim Verdau der extrazellulären Matrix und der Zellmigration von Relevanz zu sein. Außerdem wird ihm eine Rolle bei der Myogenese zugesprochen (Duffy et al., 2003). Seine Überexpression konnte sowohl in Melanomen als auch in Brust-, Lungen-, Magen-, Pankreas-, Leber- und Prostatacarcinomen gezeigt werden. Durch seine Funktion als Sheddase scheint ADAM 9 beim Prostatacarcinom eine Rolle zu spielen. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Expression von ADAM 9 in Prostatacarcinomen zu deren Entdifferenzierung beizutragen scheint und auch auf die Tumorgröße einen Einfluss hat. Ferner geht aus klinischen Studien hervor, dass ADAM 9 neben dem „Prostata Spezifischen Antigen“ als serologischer Marker dienen kann. Der proinvasive Einfluss von ADAM 9 zeigte sich in Untersuchungen an Brust-, Lungen- und Colonicarcinomen. Im Falle des Brustcarcinoms korreliert ADAM 9 positiv mit dem HER-2 Status und dem Vorkommen von Metastasen. Die Invasion und Metastasierung von großzelligen Lungencarcinomen und Colonicarcinomen scheint durch ADAM 9 ebenfalls vorangetrieben zu werden (Mochizuki and Okada, 2007; Murphy, 2008). Wir konnten in unseren Untersuchungen eine gleichmäßige Expression von ADAM 9 in allen vier Linien feststellen.

ADAM 10:

ADAM 10 kommt eine Rolle bei der Degradierung der extrazellulären Matrix, beim shedding und bei der Zelldifferenzierung zu (Seals and Courtneidge, 2003). In malignen Tumoren wird sein Einfluss bei oralen Plattenepithel-, Magen-, Colon-, Brust- und Prostatacarcinomen sowie bei Ovarial- und Uterustumoren als auch bei Phäochromozytomen, Neuroblastomen und hämatologischen Entartungen wie Lymphomen und Leukämien beschrieben (Duffy et al., 2003; Mochizuki and Okada, 2007; Murphy, 2008; Seals and Courtneidge, 2003). ADAM 10 scheint über das shedding von Wachstumsfaktoren und Rezeptoren die Tumorproliferation voranzutreiben. Als Beispiel sei hier die Abspaltung von HER-2 genannt. Diese Abspaltung verringert im Falle des Mammacarcinoms die Wirksamkeit einer Anti-HER-2-Therapie mit Trastuzumab, da die löslichen EGF-Rezeptoren die Antikörper vor ihrem Binden an die Tumorzellen abfangen. Durch in vitro Studien konnte gezeigt werden, dass eine Kombinationstherapie, bestehend aus Trastuzumab und einem ADAM 10 Inhibitor, der Antikörpermonotherapie überlegen ist (Murphy, 2008). Oft findet in der Literatur auch das shedding des Adhäsionsmoleküls

L1 im Zusammenhang mit der Tumorzellmigration Erwähnung. ADAM 10 scheint über diesen Mechanismus die Migrations- und Invasionsbereitschaft von Tumorzellen zu steigern (Mochizuki and Okada, 2007). Bei unserem Screening kam ADAM 10 gleichmäßig in allen vier Zelllinien vor.

ADAM 11:

ADAM 11, dem in der Literatur eine tumorsuppressive Wirkung zugeschrieben wird, konnte von uns nicht nachgewiesen werden (Duffy et al., 2003).

ADAM 12:

ADAM 12 ist physiologischerweise als Sheddase aktiv, aber auch in Adhäsionsprozesse und in die Degradierung von Funktionsmolekülen (z.B. IGFBP) und extrazellulärer Matrix involviert. Die bekannteste Funktion ist jedoch seine Rolle bei der Myoblastenfusion (Mochizuki and Okada, 2007). Seine Überexpression wird in Gehirntumoren, Magen-, Darm-, Leber- und Mammacarcinomen beschrieben. Membrangebundenes ADAM 12 scheint durch die Prozessierung von HB-EGF die Proliferation von Tumorzellen voranzutreiben, wie Versuche mit Glioblastomzellen gezeigt haben. Weiterhin scheint die Bindung der cysteinreichen Domäne an Syndecane das Aussprossen von Tumorzellen zu fördern. Zusammen mit dem Verdau der extrazellulären Matrix hat dies eine proinvasive Wirkung. Beim Brustkrebs scheint ADAM 12 sogar als klinischer Progressionsmarker verwendet werden zu können (Murphy, 2008). Von uns konnte ADAM 12 in allen vier Linien nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine Bandendominanz in den Linien Jar und Ach3p. Ob dies eine wirkliche Expressionsdifferenz oder nur eine Pipettier- oder RT-PCR-Ungenauigkeit darstellt, kann in dieser Arbeit nicht abschließend beurteilt werden, da im ersten RT-PCR-Durchlauf keine Banden erkennbar waren und ein dritter Ansatz nicht durchgeführt wurde.

ADAM 15:

ADAM 15 ist an der Degradierung der extrazellulären Matrix und der Gefäßfunktion beteiligt. Außerdem bindet ADAM 15 Integrine über eine RGD-Sequenz in seiner Disintegrin-Domäne, weshalb es unter den ADAMs hervorsteht (Duffy et al., 2003). Seine Überexpression wurde in Brust-, Lungen-, Magen- und Prostatacarcinomen festgestellt. Bei letzterem ergibt sich eine proportionale Korrelation zwischen ADAM 15 und dem Tumorgrading mittels sog. Gleason-Score. Auch beim Tumorwachstum und der

Metastasierung nach Gefäßinvasion scheint ADAM 15 mitzuwirken (Murphy, 2008). Wir konnten ADAM 15 homogen in allen vier Chorioncarcinomlinien nachweisen.

ADAM 17:

ADAM 17 der „shedding-Star“ unter den ADAMs ist für das shedding einer Vielzahl von Substraten (TNF- α , TGF- α , HB-EGF, Notch, L-Selektin...) verantwortlich. Wobei mit TNF- α und seinem Rezeptor wohl die bekanntesten Vertreter genannt sind, wenngleich die anderen Substrate in ihren Funktionen nicht minder wichtig sind (Duffy et al., 2003). Eine erhöhte Expression von ADAM 17 konnte in Tumoren des Gehirns, der Lunge, der Brust, des Magens, der Leber, des Pankreas, des Dickdarms, der Nieren, der Ovarien und der Prostata nachgewiesen werden. Aus klinischen Studien zum Mammacarcinom zeigte sich, dass die Expression von ADAM 17 mit dem Grad an Malignität anstieg und die Überlebenszeit mit der Expression umgekehrt korrelierte. Außerdem führten in vitro Untersuchungen zu dem Ergebnis, dass eine Behandlung mit Anti-ADAM 17 Antikörpern zu einer Reduktion des Tumorzellwachstums führte. Beim Colonicarcinom scheint das shedding des IL 6 Rezeptors durch ADAM 17 mit dem Tumorwachstum in Zusammenhang zu stehen. Ein weiterer tumorimmunologisch interessanter Aspekt ist, dass ADAM 17 die MHC I ähnlichen Moleküle MICA und MICB, zwei Liganden des NK-Zellen aktivierenden Rezeptors NKG2D, shedden könnte. Die Nicht-Aktivierung des NK-Zell-Rezeptors führt zu seinem Abbau. Dieser Mechanismus könnte somit beim immun escape von Tumorzellen eine Rolle spielen (Mochizuki and Okada, 2007; Murphy, 2008). Wir konnten in unserer Untersuchung ADAM 17 gleichmäßig in allen vier Zelllinien nachweisen.

ADAM 19:

ADAM 19 ist über das shedding des EGF-Rezeptor Liganden Neuregulin β an der Neurogenese beteiligt. Außerdem scheint es wie ADAM 9 und 12 eine Rolle bei der Myogenese zu spielen (Seals and Courtneidge, 2003). Seine Überexpression konnte in Gehirn- und Nierentumoren gezeigt werden und scheint mit der Invasionsbereitschaft in Zusammenhang zu stehen. Die genaue Rolle von ADAM 19 im Tumorgeschehen ist im Moment jedoch noch ungewiss (Mochizuki and Okada, 2007). Wir konnten ADAM 19 mittels RT-PCR in allen vier Linien homogen nachweisen.

ADAM 28:

ADAM 28 kommt sowohl in membrangebundener als auch in sezernierter Form vor. Neben der Fähigkeit, Integrine zu binden, ist vor allem die Proteasefunktion von ADAM 28 bedeutend. Die katalytische Aktivität von ADAM 28 wird durch MMP 7 aktiviert und kann durch TIMP 1, 2, 3 und 4 inhibiert werden, wobei TIMP 3 hier hervorzuheben ist. Ein weiterer Inhibitor ist das Hydroxamsäurederivat KB-R7785. Physiologischerweise spielt ADAM 28 beim shedding des low affinity IgE-Rezeptors FcεRII (CD 23) sowie beim Spalten des myelin basic proteins und des IGFBP 3 eine Rolle. Somit kommt ihm eine Funktion bei Prozessen der Immunantwort, der Gehirnfunktion und der Proliferation zu (Mochizuki and Okada, 2007; Ohtsuka et al., 2006). Seine Überexpression ist in Lungen-, Brust- und Nierencarcinomen beschrieben. In großzelligen Lungencarcinomen zeigte sich eine positive Korrelation zwischen ADAM 28 (membrangebunden und sezerniert) und der Tumorpheriferation und lymphogenen Metastasierung. Beim invasiven Mammacarcinom konnte ebenfalls eine Überexpression beider ADAM 28 Varianten festgestellt werden. Hier scheint die Spaltung des IGFBP 3 durch ADAM 28 eine zentrale Rolle für die Proliferation der Tumorzellen zu spielen. IGFBP 3 bindet physiologischerweise IGF 1 und verhindert somit dessen Andocken an Wachstumsrezeptoren der Zellen. Über diesen Mechanismus ist eine Steuerung des Zellwachstums möglich. Beim Mammacarcinom ist dieser Regelkreis nun gestört. Durch die Überexpression von ADAM 28 kommt es zu einer gesteigerten Spaltung von IGFBP 3. In dessen Folge wird vermehrt IGF 1 frei, wodurch letztendlich die Tumorpheriferation angeregt wird. In vitro und in vivo Experimente haben gezeigt, dass sich dieser Effekt durch die Inhibierung oder Downregulation von ADAM 28 abschwächen lässt (Mochizuki and Okada, 2007). Wir konnten ADAM 28 in zwei RT-PCR Durchläufen in den Linien Jar, Jeg3 und dessen Tochterlinie Ach3p nachweisen, nicht jedoch in der Linie Bewo. Im Falle von ADAM 28 war die Expression unter den Zelllinien inhomogen. Die stärkste Bandenintensität nach der Gelelektrophorese zeigte sich in der Linie Jar. Die miteinander verwandten Linien Jeg3 und Ach3p zeigten im Vergleich zu Jar schwächere Banden, die sich untereinander in ihrer Intensität glichen. In der von uns anschließend durchgeführten Realtime PCR, die für die quantitative Bestimmung Methode der Wahl ist, bestätigten sich die Ergebnisse der RT-PCR. Genauere funktionelle Untersuchungen könnten hier zeigen, in wie weit die Regulation von IGFBP 3/IGF 1 durch ADAM 28 für die Proliferation der untersuchten Chorioncarcinomlinien und/oder für die Proliferation von Trophoblasten von Bedeutung ist.

ADAMTS 1:

Bei Untersuchungen zur Interleukin-induzierten Tumorkachexie im Mausmodell gelang Kuno mit ADAMTS 1 die Entdeckung einer neuen Proteasenfamilie, den ADAMTSs (Kuno et al., 1997). Physiologischerweise kommt ADAMTS 1 eine Rolle bei der Regulation der Angiogenese und des Umsatzes der extrazellulären Matrix zu. Durch seine Thrombospondin-Domäne hemmt es die VEGF und FGF 2 induzierte Neubildung von Gefäßen. Über seine Proteaseaktivität ist ADAMTS 1 bei der Degradierung von Aggrecan, dem Haupt-Proteoglykan des Knorpels, und Versican, einem in Blutgefäßen vorkommenden Proteoglykan, beteiligt (Mochizuki and Okada, 2007; Porter et al., 2005). Eine Überexpression von ADAMTS 1 konnte im Mammacarcinom festgestellt werden. Interessanterweise scheint ADAMTS 1 in voller Länge die Proliferation und die Absiedelung von Tumorzellen zu fördern, während Fragmente von ADAMTS 1 die Metastasierung bremsen. Paradoxe Weise verbessert ADAMTS 1 die Vaskularisation von Tumoren, obwohl es physiologischerweise antiangiogene Wirkungen zeigt. Bei diesen Prozessen scheint die Fähigkeit von ADAMTS 1, HB-EGF und Amphiregulin zu shedden, von Bedeutung (Mochizuki and Okada, 2007). Wir konnten ADAMTS 1 gleichmäßig in allen vier Chorioncarcinomlinien nachweisen.

ADAMTS 5:

ADAMTS 5 bildet zusammen mit ADAMTS 1, 4, 8, 9 und 15 innerhalb der ADAMTS-Familie eine Gruppe von Vertretern, die neben anderen Metalloproteasen wie beispielsweise den MMPs in der Lage ist, Lectican zu spalten. Lectican sind Chondroitinsulfat enthaltende Proteoglykane. Sie vermögen es mittels einer Hyaluronsäure-bindenden Domäne und einer C-Typ Lectin Domäne, Glykosaminoglykane mit Proteinen der extrazellulären Matrix zu verbinden. Damit regulieren sie den schwammartigen Aufbau der extrazellulären Matrix. Die Familie der Lectican umfasst Aggrecan, Versican, Neurocan und jüngst auch Brevican. Der Abbau von Aggrecan durch ADAMTS 4 (Aggrecanase 1) und ADAMTS 5 (Aggrecanase 2) im Rahmen der Gelenksentzündung zählt zu den bekanntesten Funktionen der ADAMTSs. Physiologischerweise scheinen die Lektin-spaltenden ADAMTS-Vertreter an der Modulation der extrazellulären Matrix maßgeblich beteiligt zu sein (Porter et al., 2005; Yamaguchi, 2000). In letzter Zeit wird jedoch auch ihre Rolle im Invasionsgeschehen von malignen Tumoren immer evidenter. Hier kristallisiert sich vor allem die Interaktion zwischen ADAMTS 5 und Brevican als zentrales Ereignis im Rahmen der Invasion von

Glioblastomen heraus. Glioblastome zählen zu den häufigsten Gehirntumoren des Erwachsenenalters. Sie sind zwar mit einer Inzidenz von 2,5/100.000/Jahr eher seltene Tumoren und treten auch eher in der zweiten Lebenshälfte auf, jedoch ist ihre Prognose mit einer 5 Jahresüberlebensrate von 3 % auch heute noch infaust. Therapiemethode der Wahl ist momentan die Operation in Kombination mit Chemo- und Strahlentherapie. Leider können Glioblastome aufgrund ihrer starken Invasivität fast nie in sano entfernt werden. So führen sie durch ihr schnelles Wachstum zumeist innerhalb eines Jahres zum Tode (Böcker, 2008). In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass die Expression und Regulation von Brevican ein zentraler Pfeiler der Glioblastominvasion ist. Schon seit längerem ist bekannt, dass Metastasen im Gehirn, trotz ihrer Abstammung von Malignomen, in einer abgegrenzten und nicht invasiven Art und Weise wachsen. Während primäre Malignome des Gehirn (niedrig differenzierte Astrozytome) sehr wohl infiltrativ sind. Wie Untersuchungen ergeben haben, liegt dieser Unterschied in der Expression und Digestion von Brevican begründet. Brevican, auch BEHAB (brain enriched hyaluronan binding) genannt, ist eines der im Gehirn am meisten vorkommenden Proteoglykane und vermag Hyaluronsäure mit Tenascin-R zu vernetzen. Da im Interstitium des Gehirns keine Kollagenfibrillen vorkommen, bildet dieses Maschenwerk aus Hyaluronsäure, Brevican und Tenascin die dreidimensionale Grundlage der extrazellulären Matrix im Gehirn. Damit Tumorzellen im Gehirn ins umliegende Interstitium invadieren können, müssen sie dieses Maschenwerk aufbrechen, was durch die Spaltung von Brevican gelingt. Wie Transfektionsexperimente gezeigt haben, ist für eine erfolgreiche Invasion im Milieu des Gehirns zum einen die Expression von Brevican nötig, zum anderen aber auch dessen Spaltung. Nur fragmentiertes Brevican scheint einen proinvasiven Einfluss auf Tumorzellen zu haben. Wie sich jüngst gezeigt hat, exprimieren invasive Gehirntumoren nicht nur vermehrt Brevican, sondern auch ADAMTS 5. ADAMTS 5 ist wie ADAMTS 4 nun in der Lage, Brevican in zwei Fragmente zu spalten und hat somit einen entscheidenden Einfluss auf die Invasion von malignen Gehirntumoren. Interessanterweise scheint es auch hier so, als handle es sich um die Reaktivierung eines genetisch verankerten Mechanismus, da Brevican physiologischerweise vor allem von embryonalen Gliazellen, die während der Entwicklung des Gehirns von der periventrikulären Zone auswandern, stark exprimiert wird. Außerdem kommt es zu einer Hochregulierung von Brevican in Gliazellen bei der Ausbildung gliöser Narben im Gehirn (Held-Feindt et al., 2006; Jaworski et al., 1996; Matthews et al., 2000; Nakada et al., 2005). Wir konnten in unserem RT-PCR Screening ADAMTS 5 im ersten Durchlauf mit 27 Zyklen nur in der

Chorioncarcinomlinie Ach3p nachweisen. In einem zweiten Durchlauf mit 30 Zyklen zeigte sich zudem bei Jeg3, der „Mutterlinie“ von Ach3p, eine sehr schwache Bande. In den Linien Jar und Bewo konnten wir ADAMTS 5 nicht detektieren. Wir entschieden uns, die Expression von ADAMTS 5 in unseren 4 Chorioncarcinomlinien anschließend noch genauer mittels Realtime PCR zu untersuchen, da uns die in der Literatur beschriebene Rolle von ADAMTS 5 als interessant erschien. Dort ist zum einen die Beteiligung von ADAMTS 5 an der Tumorinvasion beschrieben. Zum anderen ist bei seiner Entdeckung durch Hurskainen erwähnt, dass ADAMTS 5 während der Peri-Implantationsperiode in murinen Trophoblasten exprimiert wird (Hurskainen et al., 1999). In der angeschlossenen Realtime PCR bestätigten sich die Ergebnisse der RT-PCR. So zeigte sich die Expression von ADAMTS 5 in den Linien Jeg3 und Ach3p. Während allerdings mit der RT-PCR in der Linie Jeg3 nur eine äußerst schwache Bande im Vergleich zur Linie Ach3p detektiert werden konnte, zeigte die Realtime PCR eine 60 % Expression von ADAMTS 5 in der Linie Jeg3 verglichen mit der in Ach3p. Für eine Interpretation der Expressionsdominanz von ADAMTS 5 in der Linie Ach3p im Vergleich zur „Mutterlinie“ Jeg 3 wäre es nötig, die Expression von ADAMTS 5 in Erstsemester-Trophoblasten zu untersuchen. Anschließend funktionelle Untersuchungen könnten noch weiter Aufschluss geben. Nach dem gelungenen Nachweis von ADAMTS 5 in den Linien Jeg3 und Ach3p auf mRNA-Ebene, entschieden wir uns dazu, die Expression von ADAMTS 5 in der Zelllinie Ach3p auf Proteinebene mittels indirekter Immunfluoreszenz zu untersuchen. Dabei konnten von uns drei verschiedene Fluoreszenzentitäten nachgewiesen werden. 80-90 % der Zellen zeigten hierbei ein eher homogenes Verteilungsmuster des Fluoreszenzsignals, mit einer deutlichen Signalverdichtung im Bereich des Zellkerns. Oft erschien das Fluoreszenzsignal einen zusätzlichen lamellären bis retikulären Aspekt zu besitzen. Zusätzlich zu diesem Verteilungsmuster von ADAMTS 5 zeigten 10-20 % der Zellen granuläre Fluoreszenzsignale, die entweder im Bereich des Zellkerns vorkamen und dort sehr deutlich erschienen oder im Zytoplasma verteilt auftraten. Auf jedem Objektträger liefen Negativkontrollen mit, die im Unterschied zu den zu untersuchenden Proben nicht mit Primärantikörper inkubiert wurden und genau wie die Proben mit einer Belichtungszeit von 200 ms belichtet wurden. Da diese Negativkontrollen kein optisch erfassbares Fluoreszenzsignal zeigten, ist davon auszugehen, dass die Bindungen des Anti-ADAMTS 5-Antikörpers in den zu untersuchenden Proben spezifisch waren. Wobei wir hiermit auch den Nachweis von ADAMTS 5 in der Linie Ach3p auf Proteinebene führen konnten. Die Frage zur intrazellulären Lokalisation von ADAMTS 5 und welche Fluoreszenzentität die

repräsentativste ist, kann mit unseren Ergebnissen nicht abschließend beurteilt werden. In diesem Zusammenhang seien die Immunfluoreszenzergebnisse mit Antikörpern gegen ADAMTS 1 der Firma Abcam erwähnt. Hier zeigten sich in Abhängigkeit vom Proteinabschnitt, gegen den die Antikörper gerichtet waren, verschiedene Fluoreszenzentitäten. Bei Antikörpern gegen den N-terminalen Abschnitt von ADAMTS 1 war eine homogene Signalverteilung im Zytoplasma zu verzeichnen (33). Während bei Antikörpern gegen den C-terminalen Abschnitt von ADAMTS 1 eine granuläre Signalgebung im Zytoplasma zu erkennen war (34).

Zukunftsansichten:

Mit den aus dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen besteht nun ein Expressionsprofil der ADAM-, ADAMTS- und ADAMTSL-Vertreter in den Chorioncarcinomlinien Jar, Jeg3, Bewo und Ach3p. In Zukunft können weitere funktionelle Untersuchungen das Bild dieser Proteinfamilien vervollständigen. Neben dem genauen Verständnis ihrer Regulationsaufgaben ist vor allem auch ihre therapeutische Beeinflussung Ziel der medizinischen Forschung. Seit die zentrale Rolle der Metalloproteasen-Domäne bei Prozessen wie der Inflammation und dem Tumorgeschehen bekannt ist, konzentriert sich die Forschung auf die Hemmung dieser Domäne. Nach herben Rückschlägen beim klinischen Einsatz von unselektiv wirkenden Chelatbildnern, konzentrieren sich die therapeutischen Ansätze nun vermehrt auf den Einsatz von physiologischen Inhibitoren wie etwa der TIMPs oder des reversion inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK). Die TIMPs scheinen zwar, verglichen mit ihren Effekten auf die MMPs, bei der Hemmung der ADAMs und ADAMTSs eher schwach. Dennoch scheinen sie eine physiologische Rolle bei der Regulation der ADAMs und ADAMTSs zu spielen. Vor allem TIMP 3 wird hier eine Funktion zugeschrieben. Er scheint der breiteste Inhibitor der ADAMs und ADAMTSs zu sein und auch im Tumorgeschehen eine Rolle zu spielen. Wie knock out-Versuche gezeigt haben, resultiert eine TIMP 3 Defizienz in einem verstärkten Tumorwachstum und einer gesteigerten Angiogenese. Bei Untersuchungen mit humanen Tumoren korrelierte eine erniedrigte TIMP 3 Expression mit einem aggressiveren Tumorphänotyp. Der in diesen Tumoren nachgewiesene hohe Methylierungsgrad der TIMP 3 Promoterregion weist auf die Rolle von TIMP 3 als Tumorsuppressorgen hin. Ebenso scheint der Einsatz von Substanzen Erfolg versprechend, die der Proteasen-Domäne benachbarte Regionen (z.B. Spacerregion) beeinflussen und somit zu einer Hemmung der Proteasefunktion führen (Mochizuki and Okada, 2007; Murphy, 2008;

Porter et al., 2005). Da sich bei der Regulation der Metalloproteasen samt Inhibitoren und Substrate noch viele Fragen aufwerfen, wird ihre therapeutische Beeinflussbarkeit und deren Einzug in den klinischen Alltag sicherlich noch einige Zeit in Anspruch nehmen. Sicher ist jedoch, dass ein Eingriff in dieses hochkomplexe System spezifisch erfolgen muss, um bei einer ausreichenden Wirksamkeit möglichst wenige Nebenwirkungen zu erzeugen und um somit klinisch erfolgreich einsetzbar sein zu können.

6 Abkürzungen

ADAM	A-Disintegrin-And-Metalloprotease
ADAMTS	A-Disintegrin-And-Metalloprotease with Thrombo-Spondin motifs
ADAMTSL	A-Disintegrin-And-Metalloprotease with Thrombo-Spondin motifs-Like
AT	Adenin-Thymin
ATCC	American-Type-Culture-Collection
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
BCP	1-Brom-3-Chlor-Propan
BEHAB	Brain-Enriched-Hyaluronan-Binding
bFGF	basic-Fibroblast-Growth-Factor
bp	Basenpaar
BSA	Bovines-Serum-Albumin
ca.	Circa
cDNA	complementary DNA
cm ²	Quadratzenimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CSF-1-R	Colony-Stimulating-Factor-1-Receptor
D-	Dexter aus dem Lateinischen für rechts
DAPI	4',6-Di-Amidino-2'-Phenyl-Indol
DEPC	Di-Ethyl-Pyro-Carbonat
DMEM	Dulbecco's-Modified-Eagle-Medium
DMSO	Di-Methyl-Sulf-Oxid
DNA	Desoxyribo-Nuclein-Acid
dNTP	desoxyribo-Nukleosid-Tri-Phosphat
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat
EGF	Epidermal-Growth-Factor
EPF	Early-Pregnancy-Factor
EVT	Extra-Villöser-Trophoblast
eEVT	endovaskulärer-Extra-Villöser-Trophoblast
evtl.	Eventuell
Fab	Fragment-antigen-bindend

Fc	Fragment-cristallisierbar
FGF	Fibroblast-Growth-Factor
FKS	Fetales-Kälber-Serum
°C	Grad Celsius
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
grie.	Griechisch
HB-EGF	Heparin-Binding-Epidermal-Growth-Factor
HBSS	Hank´s-Balanced-Salt-Solution
hCG	humanes-Chorion-Gonadotropin
hCS	humanes-Chorion-Somatomammotropin
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	Hydroxy-Ethyl-Piperazin-Ethan-Sulfonsäure
HER	Human-Epidermal growth factor-Receptor
HLA-G	Humanes-Leukozyten-Antigen-G
hPL	humanes-Plazenta-Laktogen
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phospho-Ribosyl- Transferase
H ₂ O	Wasser
HWZ	Halbwertszeit
IDO	Indolamin-2,3-Di-Oxygenase
Ig	Immunglobulin
IGF	Insulin like-Growth-Factor
IGFBP	Insulin like-Growth-Factor-Binding-Protein
IL	Inter-Leukin
kg	Kilogramm
L	Liter
L-	Laevus aus dem Lateinischen für links
LE	Low-Electroendosmosis
M	Molar
MAD	Mitotic-Arrest-Deficient
MDC	Metalloprotease-Disintegrin-Cystinreich
MEM	Minimum-Essential-Medium nach Eagle
MHC	Major-Histocompatibility-Complex
min	Minute

ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMP	Matrix-Metallo-Protease
mosmol	Milliosmol
mRNA	messenger RNA
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogenkarbonat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NEAS	Nicht-Essentielle-Amino-Säuren
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
PBS	Phosphat-Buffered-Saline
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
pg	Pikogramm
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Oxoniumionenkonzentration
PlGF	Placenta-Growth-Factor
P/S	Penicillin/Streptomycin
PVDF	Poly-Vinyliden-Fluorid
RECK	REversion inducing-Cysteine rich protein with-Kazal motifs
rER	rauhes-Endoplasmatisches-Retikulum
RNA	Ribo-Nuclein-Acid
rpm	Round per Minute
RPMI	Kulturmedium benannt nach dem Roswell-Park-Memorial-Institute
RT	Reverse-Transkriptase

S	Svedberg
sek	Sekunde
SH3	Src-Homology-3
sog.	Sogenannt
Src	Sarcoma
ST	Synzytio-Trophoblast
SVMP	Snake-Venom-Metallo-Protease
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TE	Tris-EDTA
TGF- α	Transforming-Growth-Factor- α
TH-2	T-Helferzelltyp-2
TIMP	Tissue-Inhibitor of-Metallo-Proteinase
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
Tris	Tris(-hydroxymethyl-aminomethan)
TSP	ThromboSpondin
TSR	ThromboSpondin-Repeat
U	Units
uNK	uterine-Natürliche-Killerzelle
unverd.	Unverdünnt
UV	Ultra-Violett
VEGF	Vascular-Endothelial-Growth-Factor
vgl.	Vergleiche
x	Fach
z.B.	Zum Beispiel
ZT	Zyto-Trophoblast

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Trophoblasten- u. Melanominvasion.....	2
Abbildung 1.2 Implantation der Blastozyste	3
Abbildung 1.3 Trophoblasteninvasion	4
Abbildung 1.4 Chorioncarcinom	10
Abbildung 1.5 Chorioncarcinomlinien	13
Abbildung 1.6 Klassifikation ADAMs und ADAMTSs	16
Abbildung 1.7 Domänenstruktur ADAM, ADAMTS und ADAMTSL.....	17
Abbildung 1.8 Aktives Zentrum der Metzinkine	20
Abbildung 1.9 Domänenstruktur Thrombospondin	24
Abbildung 2.1 Aufbau Diplomarbeit.....	27
Abbildung 3.1 Nativaufnahmen Jar, Jeg3, Bewo und Ach3p	35
Abbildung 3.2 Anheftungsvorgang adhärent wachsender Zellen	37
Abbildung 3.3 Elektronenmikroskopische Mykplasmenaufnahmen.....	40
Abbildung 3.4 Prinzip OneStep RT-PCR.....	52
Abbildung 3.5 Prinzip Reverse Transkription.....	53
Abbildung 3.6 Pufferkationeneinfluss beim Primerannealing	54
Abbildung 3.7 Signalgebung durch SYBR Green I	59
Abbildung 3.8 Lineare Graphendarstellung Realtime PCR	60
Abbildung 3.9 Standardkurven Realtime PCR.....	60
Abbildung 3.10 Quantifizierungsstrategien Realtime PCR.....	61
Abbildung 3.11 Indirekte Zweischnitt-Immunfluoreszenzfärbung.....	67
Abbildung 3.12 Antikörperfragmente nach Enzymverdau.....	68
Abbildung 3.13 Antikörperklonalität	70
Abbildung 4.1 Fotodokumentation RNA-Qualität	76
Abbildung 4.2 Lineardarstellung Realtime PCR L 30	90
Abbildung 4.3 Schmelzkurve L 30 (1. Ableitung)	90
Abbildung 4.4 cDNA-Standardkurven ADAMTS 5 und L 30.....	91
Abbildung 4.5 Lineardarstellung Realtime PCR ADAM 28.....	92
Abbildung 4.6 Schmelzkurve ADAM 28 (1. Ableitung)	92
Abbildung 4.7 Quantitative und semiquantitative Darstellung ADAM 28	93
Abbildung 4.8 Lineardarstellung Realtime PCR ADAMTS 5	94
Abbildung 4.9 Schmelzkurve ADAMTS 5 (1. Ableitung).....	95

Abbildung 4.10 Quantitative und semiquantitative Darstellung ADAMTS 5	96
Abbildung 4.11 Fluoreszenzaufnahmen Ach3p zur Übersicht.....	97
Abbildung 4.12 Homogen bis lamellär retikulärer Fluoreszenztyp	99
Abbildung 4.13 Homogen bis lamellär retikulärer Fluoreszenztyp	100
Abbildung 4.14 Nukleär granulärer Fluoreszenztyp	101
Abbildung 4.15 Zytoplasmatisch granulärer Fluoreszenztyp.....	102
Abbildung 4.16 Negativkontrolle bei 200 ms Belichtungszeit	103

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1 Geräte Zellkultur	28
Tabelle 3-2 Gebrauchsmaterial Zellkultur.....	29
Tabelle 3-3 Chemikalien und Lösungen Zellkultur.....	30
Tabelle 3-4 Kulturmedien Zellkultur.....	31
Tabelle 3-5 Geräte RNA-Isolierung	44
Tabelle 3-6 Gebrauchsmaterial RNA-Isolierung.....	44
Tabelle 3-7 Chemikalien und Lösungen RNA-Isolierung.....	45
Tabelle 3-8 Geräte RT-PCR	49
Tabelle 3-9 Gebrauchsmaterial RT-PCR.....	50
Tabelle 3-10 Chemikalien, Lösungen und Kits RT-PCR.....	50
Tabelle 3-11 Verwendete Primersequenzen ADAMs	51
Tabelle 3-12 Verwendete Primersequenzen ADAMTSs und ADAMTSLs.....	52
Tabelle 3-13 Mastermix RT-PCR.....	55
Tabelle 3-14 Geräte Realtime PCR	57
Tabelle 3-15 Gebrauchsmaterial Realtime PCR.....	57
Tabelle 3-16 Kits Realtime PCR	57
Tabelle 3-17 Mastermix random RT	62
Tabelle 3-18 Mastermix RT(-)	62
Tabelle 3-19 Realtime PCR-Mastermix Verdünnungsreihe.....	63
Tabelle 3-20 Realtime PCR-Mastermix	63
Tabelle 3-21 Geräte Immunfluoreszenz	65
Tabelle 3-22 Gebrauchsmaterial Immunfluoreszenz.....	65
Tabelle 3-23 Chemikalien, Lösungen und Antikörper Immunfluoreszenz	66
Tabelle 4-1 Übersicht nachgewiesene Vertreter RT-PCR.....	88
Tabelle 4-2 Ct-Wertetabelle ADAM 28, L 30.....	93
Tabelle 4-3 Ct-Wertetabelle ADAMTS 5, L30.....	95

9 Bibliographie

Adams, J.C. & Tucker, R.P. (2000) The thrombospondin type 1 repeat (TSR) superfamily: diverse proteins with related roles in neuronal development. *Developmental Dynamics*, **218**, 280-299.

Benirschke, K. & Kaufmann, P. (2000) *Pathology of the human placenta*. Springer Verlag,
Blobel, C.P. et al. (1992) A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature*, **356**, 248-252.

Böcker, W. (2008) *Lehrbuch Pathologie mit StudentConsult-Zugang*. Urban & Fischer Verlag.

Boxberger, H.J. (2006) *Leitfaden für die Zell-und Gewebekultur: Einführung in Grundlagen und Techniken*. Wiley-VCH.

Burke, F.V. (1933) The pH of Formalin - A Factor in Fixation: Adjustment and Stabilization of the Hydrogen Ion Concentration of Formalin Solutions. *Am J Pathol*, **9**, 915-920.

Carey, D.J. (1997) Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem J*, **327**, 1-16.

Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**, 156-159.

Drexler, H.G. & Uphoff, C.C. (2002) Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology*, **39**, 75-90.

Duffy, M.J. et al. (2003) The ADAMs family of proteins: from basic studies to potential clinical applications. *Thromb Haemost*, **89**, 622-631.

Funayama, H. et al. (1997) Parent cells for trophoblast hybridization II: AC1 and related trophoblast cell lines, a family of HGPRT-negative mutants of the choriocarcinoma cell line JEG-3. *Placenta*, **18**, 191-201.

Gomis-Ruth, F.X. (2009) Catalytic domain architecture of metzincin metalloproteases. *J Biol Chem*, **284**, 15353-15357.

Greene, J.J. & Rao, V.B. (1998) *Recombinant DNA principles and methodologies*. CRC.

Hartmann, M. et al. (2008) *Zytologie, Histologie und Mikroskopische Anatomie: Licht- und elektronenmikroskopischer Bildatlas*. facultas.wuv Universitätsverlag.

Held-Feindt, J. et al. (2006) Matrix-degrading proteases ADAMTS4 and ADAMTS5 (disintegrins and metalloproteinases with thrombospondin motifs 4 and 5) are expressed in human glioblastomas. *Int J Cancer*, **118**, 55-61.

Helgason, C.D. & Miller, C.L. (2004) *Basic cell culture protocols*. Humana Pr Inc.

Hertz, R. (1959) Choriocarcinoma of women maintained in serial passage in hamster and rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)*, **102**, 77.

Hiden, U. et al. (2008) MT1-MMP Expression in First-Trimester Placental Tissue Is Upregulated in Type 1 Diabetes as a Result of Elevated Insulin and Tumor Necrosis Factor- α Levels. *Diabetes*, **57**, 150.

Hiden, U. et al. (2007) The first trimester human trophoblast cell line ACH-3 P: A novel tool to study autocrine/paracrine regulatory loops of human trophoblast subpopulations – TNF- α stimulates MMP 15 expression. *BMC Developmental Biology*, **7**, 137.

Hirohata, S. et al. (2002) Punctin, a novel ADAMTS-like molecule, ADAMTSL-1, in extracellular matrix. *J Biol Chem*, **277**, 12182-12189.

Hof, H. & Dörries, R. (2004) *Medizinische Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag.

Hooper, N.M. (2010) *The ADAM Family of Proteases*. Springer US.

Howard, L. et al. (1999) Interaction of the metalloprotease disintegrins MDC9 and MDC15 with two SH3 domain-containing proteins, endophilin I and SH3PX1. *J Biol Chem*, **274**, 31693-31699.

Hurskainen, T.L. et al. (1999) ADAM-TS5, ADAM-TS6, and ADAM-TS7, novel members of a new family of zinc metalloproteases. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 25555.

Jaworski, D.M. et al. (1996) BEHAB (brain enriched hyaluronan binding) is expressed in surgical samples of glioma and in intracranial grafts of invasive glioma cell lines. *Cancer Res*, **56**, 2293-2298.

Kirby, K.S. (1956) A new method for the isolation of ribonucleic acids from mammalian tissues. *Biochemical Journal*, **64**, 405.

Kohler, P.O. & Bridson, W.E. (1971) Isolation of hormone-producing clonal lines of human choriocarcinoma. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **32**, 683.

Kuno, K. et al. (1997) Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloproteinase-disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene. *J Biol Chem*, **272**, 556-562.

Lindl, T. (2002) *Zell- und Gewebekultur*. Spektrum Akademischer Verlag.

Löffler, G. (2008) *Basiswissen Biochemie: mit Pathobiochemie (Springer-Lehrbuch)*. Springer, Berlin.

Matthews, R.T. et al. (2000) Brain-enriched hyaluronan binding (BEHAB)/brevican cleavage in a glioma cell line is mediated by a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS) family member. *J Biol Chem*, **275**, 22695-22703.

- Mazur, P. & Schmidt, J.J. (1968) Interactions of cooling velocity, temperature, and warming velocity on the survival of frozen and thawed yeast. *Cryobiology*, **5**, 1-17.
- Mochizuki, S. & Okada, Y. (2007) ADAMs in cancer cell proliferation and progression. *Cancer Sci*, **98**, 621-628.
- Moore, K., Persaud, T.V.N. & Viebahn, C. (2007) *Embryologie: Entwicklungsstadien-Frühentwicklung-Organogenese-Klinik*. Elsevier, Urban&FischerVerlag.
- Mülhardt, C. (2008) *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. Springer.
- Mullen, C.A. (1998) Review: analogies between trophoblastic and malignant cells. *Am J Reprod Immunol*, **39**, 41-49.
- Murphy, G. (2008) The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. *Nature Reviews Cancer*, **8**, 932-941.
- Murray, M.J. & Lessey, B.A. (1999) Embryo implantation and tumor metastasis: common pathways of invasion and angiogenesis. *Semin Reprod Endocrinol*, **17**, 275-290.
- Nakada, M. et al. (2005) Human glioblastomas overexpress ADAMTS-5 that degrades brevican. *Acta Neuropathol*, **110**, 239-246.
- Ohtsuka, T. et al. (2006) ADAM28 is overexpressed in human non-small cell lung carcinomas and correlates with cell proliferation and lymph node metastasis. *Int J Cancer*, **118**, 263-273.
- Pattillo, R.A. & Gey, G.O. (1968) The establishment of a cell line of human hormone-synthesizing trophoblastic cells in vitro. *Cancer Research*, **28**, 1231.
- Pattillo, R.A. et al. (1971) The JAR cell line—continuous human multihormone production and controls. *Vitro*, **6**, 398.

Pegg, D.E. (2002) The history and principles of cryopreservation. *Semin Reprod Med*, **20**, 5-13.

Pfaffl, M.W., für Physiologie, L. & für Ernährung, W.W. (2004) Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOSpektrum*, **1**, 92-95.

Pinto, F.L. et al. (2009) Analysis of current and alternative phenol based RNA extraction methodologies for cyanobacteria. *BMC Mol Biol*, **10**, 79.

Porter, S. et al. (2005) The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem J*, **386**, 15-27.

Primakoff, P., Hyatt, H. & Tredick-Kline, J. (1987) Identification and purification of a sperm surface protein with a potential role in sperm-egg membrane fusion. *J Cell Biol*, **104**, 141-149.

Roitt, I.M., Brostoff, J. & Male, D.K. (1995) *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*. Thieme.

Seals, D.F. & Courtneidge, S.A. (2003) The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes & development*, **17**, 7.

Stanbridge, E. (1971) Mycoplasmas and cell cultures. *Bacteriol Rev*, **35**, 206-227.

Wolfe, M.W. (2006) Culture and transfection of human choriocarcinoma cells. *Methods Mol Med*, **121**, 229-239.

Wolfsberg, T.G. et al. (1993) The precursor region of a protein active in sperm-egg fusion contains a metalloprotease and a disintegrin domain: structural, functional, and evolutionary implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 10783-10787.

Wolfsberg, T.G. et al. (1995a) ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin And Metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. *Journal of Cell Biology*, **131**, 275.

Wolfsberg, T.G. et al. (1995b) ADAM, a Widely Distributed and Developmentally Regulated Gene Family Encoding Membrane Proteins with A_Disintegrin A_N Metalloprotease Domain. *Developmental Biology*, **169**, 378-383.

Yamaguchi, Y. (2000) Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci*, **57**, 276-289.

10 Internetquellenverzeichnis

1 <http://webeye.ophth.uiowa.edu/eyeforum/cases/case15.htm>

(Abruf 05.08.10)

2 <http://www.biolreprod.org/content/74/5/896/F1.large.jpg>

(Abruf 05.08.10)

3 http://people.virginia.edu/~jw7g/Table_of_the_ADAMs.html

(Abruf 22.09.10)

4 http://www.paa.com/products/cell_culture_products.html

(Abruf 13.02.2010)

5 <http://www.lgcstandardsatcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=HTB144&Template=cellBiology>

(Abruf 15.02.2010)

6 <http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=HTB-36&Template=cellBiology>

(Abruf 15.02.2010)

7 <http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=CCL-98&Template=cellBiology>

(Abruf 15.02.2010)

8 http://www.paa.com/techinfo/protocolforuse/reagenst_msds0/accutase.html

(Abruf 16.02.2010)

9 http://www.lonzabio.com/uploads/tx_mwaxmarketingmaterial/18886_MycoAlert_Mycoplasma_Detection_Kit.pdf

(Abruf 20.02.2010)

10 <http://www.ambion.com/techlib/basics/rnasecontrol/index.html>

(Abruf 27.02.10)

11 <http://www.mrcgene.com/tri.htm>

(Abruf 26.02.10)

12 <http://www.carl-roth.de/catalogue/catalogue.do;jsessionid=395BCD09303E544734AD938C61CC7F0B?id=8655&favOid=0000000100001a7f00020023&act=showBookmark&lang=de-de&catId=DE>

(Abruf 28.02.10)

13 <http://www.carl-roth.de/website/de-de/pdf/Phenol.pdf>

(Abruf 28.02.10)

- 14** <http://www.mrcgene.com/bcp.htm>
(Abruf 28.02.10)
- 15** <http://www.nanodrop.com/Library/nd-1000-v3.7-users-manual-8.5x11.pdf>
(Abruf 01.03.10)
- 16** <http://www.qiagen.com/literature/render.aspx?id=2061>
(Abruf 06.07.10)
- 17** http://www.qiagen.com/hb/omniscrpttrtkit_en
(Abruf 06.07.10)
- 18** <http://www.qiagen.com/literature/render.aspx?id=23494>
(Abruf 06.07.10)
- 19** http://www.qiagen.com/hb/sensiscrpttrtkit_en
(Abruf 06.07.10)
- 20** <http://www.qiagen.com/literature/render.aspx?id=387>
(Abruf 06.07.10)
- 21** <http://www.qiagen.com/literature/render.aspx?id=23490>
(Abruf 12.07.10)
- 22** <http://docs.appliedbiosystems.com/pebiiodocs/04375575.pdf>
(Abruf 12.07.10)
- 23** <http://docs.appliedbiosystems.com/pebiiodocs/00104699.pdf>
(Abruf 12.07.10)
- 24** <https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=601055>
(Abruf 12.07.10)
- 25** <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/4311235>
(Abruf 12.07.10)
- 26** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/nuccore/15812218?report=genbank>
(Abruf 14.07.10)
- 27** http://www.ihcworld.com/_books/Dako_Handbook.pdf
(Abruf 17.07.10)
- 28** <http://www.bioreagents.com/products/productDetails/productDetails.cfm?catnbr=PA1-1751A>
(Abruf 17.07.10)

29 <http://www.jireurope.com/technical/select.asp>

(Abruf 17.07.10)

30 http://www.dianova.de/downloads/ImFAQ/dianova_AK6Schritte_003.pdf

(Abruf 17.07.10)

31 http://www.biotium.com/product/product_info/Protocol/phalloidin.pdf

(Abruf 18.07.10)

32 <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp01306.pdf>

(Abruf 18.07.10)

33 <http://www.abcam.com/ADAMTS1-antibody-Aminoterminal-end-ab28284.html#images>

(Abruf 20.07.10)

34 <http://www.abcam.com/ADAMTS1-antibody-Carboxyterminal-end-ab39194.html#images>

(Abruf 20.07.10)

11 Lebenslauf

Name: Dietl, Sebastian

derzeitige Adresse: Hofgartenstr. 15
97294 Unterpleichfeld
Deutschland

Geburtsdatum: 21.11.1983

Geburtsort: Mellrichstadt (Bayern)

Staatsangehörigkeit: deutsch

Religion: römisch katholisch

Familienstand: verheiratet

Eltern: Johanna Dietl (Hausfrau)
Johannes Dietl (Heilpraktiker)

Geschwister: Magdalena Dietl
Anna-Maria Dietl
Johanna Dietl

Schulbesuch: 1990-1994 Grundschule Aura
1994-1996 Gymnasium Bad Kissingen
1996-2003 Gymnasium Bad Neustadt/Saale

Schulabschluss: Allgemeine Hochschulreife 2003

Zivildienst: 2003-2004 Neurologische Klinik GmbH Bad Neustadt/Saale

Praktika: 2005 Neurologische Klinik GmbH Bad Neustadt/Saale
2005 Herz- u. Gefäßklinik GmbH Bad Neustadt/Saale

Studium: 2005-2011 Humanmedizin an der
Medizinischen Universität Graz

Famulatur: Neurologische Klinik GmbH Bad Neustadt/Saale (Prof. Dr.
Steube)
Medizinische Klinik u. Poliklinik II Gießen (Prof. Dr.
Seeger)
Krankenhaus der Elisabethinen GmbH Graz (Prof. Dr.
Rosanelli)
Krankenhaus der Elisabethinen GmbH Graz (Dr. Neuhold)
Univ. Klinik für Kinder- u. Jugendheilkunde Graz (Prof. Dr.
Müller)

Studienassistentz: 2009-2010 auf dem Institut für Pathophysiologie und Immunologie

derzeit: Doktorand an der Universitätskinderklinik Würzburg bei Herrn Prof. Dr. Schlegel