

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
Der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. E. Herting

In- vitro- Untersuchungen der Regulation
der Insulin- Like- Growth- Faktor- Genexpression in humanen fetalen
Lungenfibroblasten durch Steroidhormone
mittels RT- PCR, Northernblot und Realtime- PCR

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Sandra Koelbel
aus Elmshorn

Lübeck 2004

1. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. H. Lehmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. P. Zabel

Tag der mündlichen Prüfung: 10.06.2005

Zum Druck genehmigt; Lübeck, den 10.06.2005

Gez. Prof. Dr. med. W. Jelkmann

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis.....	6
1 Einleitung.....	7
1.1 Das System der Insulin- Like- Growth- Factors	9
1.1.1 IGF-I und IGF-II.....	9
1.1.2 Die IGF- Rezeptoren.....	10
1.1.3 Die IGF- Bindungsproteine.....	11
1.2 Faktoren, die klinisch einen Einfluss auf die Lungenreifung haben	11
1.3 Die Rolle des IGF- Systems bei der Lungenentwicklung	12
1.4 Fragestellung	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Zellkultur	14
2.2 RNA- Isolierung	16
2.3 RNA- Analyse	18
2.4 Spezifische Primer für die PCR	19
2.5 RT- PCR	21
2.5.1 IGF I.....	22
2.5.2 IGF II.....	22
2.5.3 IGF I Rezeptor	22
2.5.4 IGF II Rezeptor.....	23
2.5.5 IGF-BP-2.....	23
2.5.6 IGF-BP-3.....	23
2.6 Klonierung der PCR- Produkte	24
2.7 Restriktionsansatz und Analyse des Plasmids	27
2.8 Northernblot	28
2.8.1 RNA- Gel für Northernblot	28
2.8.2 Herstellung einer radioaktiv markierten Sonde.....	29
2.8.3 Hybridisierung.....	31
2.9 Realtime- PCR (TaqMan®- PCR)	31
2.9.1 Spezifische Primer für die TaqMan®- PCR.....	32
2.9.2 TaqMan®- PCR- Sonde	33
2.9.3 Reaktionsbedingungen der TaqMan®- PCR	34
2.9.4 Quantifizierungsstrategien.....	36
2.9.5 Mathematische Beschreibung der zur Auswertung verwendeten vergleichenden CT- Methode.....	37
3 Ergebnisse.....	40
3.1 Zellkultur	40
3.2 RNA- Isolierung und Qualitätskontrolle	42
3.3 RT- PCR	47
3.4 Klonierung der PCR- Produkte	49

3.5	Northernblot	50
3.5.1	Qualitative und quantitative Analyse der Northernblots	52
3.6	Taq- Man®- PCR	56
4	Diskussion.....	63
4.1	Zellkultur	63
4.2	RNA- Analyse	64
4.3	RT- PCR	65
4.4	Northernblot	66
4.5	TaqMan- PCR	69
5	Zusammenfassung.....	71
6	Literaturverzeichnis	72
7	Anhang	78
7.1	Zusammensetzung der nicht kommerziell erworbenen Medien und Lösungen	78
7.2	Darstellung des verwendeten Plasmidvektors	81
8	Danksagung	82
9	Lebenslauf	83

Abkürzungsverzeichnis

ATCC	American Type Culture Collection
BPD	bronchopulmonale Dysplasie
BSA	Rinderserum
CPM	count per million
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHT	Dihydrotestosteron
DMEM	Dulbeco's Minimum Essential Medium
DNA	Desoxyribonucleinsäure
cDNA	copy- DNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fetal Calv Serum
FPF	Fibroblasten- Pneumozyten- Factor
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat- Dehydrogenase
IGF	Insulin- Like- Growth- Factor
IGF-R	Insulin- Like Growth- Factor Rezeptor
IGF-BP	Insulin- Like- Growth- Factor- Binding- Protein
IR	Insulinrezeptor
KGF	Keratinocyte- Growth- Factor
dNTP	desoxy- Nucleotidtriphosphat
dCTP	desoxy- Cytidintriphosphat
dTTP	desoxy- Thymintriphosphat
dATP	desoxy- Adenosintriphosphat
dGTP	desoxy- Guanidintriphosphat
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
RDS	Respiratory Distress Syndrome
RNA	Ribonucleinsäure
mRNA	messenger RNA
rRNA	ribosomale RNA
RT-PCR	Reverse- Transcription mit PCR
SF	Surfactant Factor
SSW	Schwangerschaftswoche
SSC	Standard Saline Citrat
TGF β	Transforming- Growth- Factor
TBE	Tris- Borat- EDTA

1 Einleitung

Frühgeburtlichkeit ist trotz besserer intensivmedizinischer Möglichkeiten noch immer ein aktuelles Problem in Deutschland. Fast 10% aller Neugeborenen kommen vor Beendigung der 38. Schwangerschaftswoche (SSW) auf die Welt.

Heute kann man davon ausgehen, dass etwa 85% der Frühgeborenen, die vor der 30. SSW geboren werden (bei einem Geburtsgewicht von 1000-1500g), überleben. Selbst sehr unreife Frühgeborene der 24. SSW können die Neonatalperiode überleben.

Die Probleme der Frühgeborenen bestehen nach wie vor in der Unreife vieler Organsysteme, die zur Einschränkung der Organfunktion führt. Im Vordergrund steht dabei die Reifung der Lunge, die erst in der Spätschwangerschaft einsetzt. Mangelnde Lungenreife kann postpartal zu akuten und chronischen Folgeerkrankungen führen, wie z.B. dem Atemnotsyndrom (Respiratory Distress Syndrome = RDS) mit dem histologischen Bild der hyalinen Membranen. Ebenfalls kommt es häufig in Folge einer längeren Beatmung während der Neonatalperiode zu bronchopulmonaler Dysplasie (BPD).

Entscheidend für die Lungenreife ist eine oberflächenaktive Substanz, der sogenannte Surfactant Faktor (SF). Dieser wird ab der 28.- 30. SSW in den Alveolarzellen vom Typ II, den Typ II- Pneumozyten, synthetisiert. In der reifen Lunge kleidet der SF die Alveolen aus. So wird ein Kollabieren der Lunge bei der Expiration durch Herabsetzen der Oberflächenspannung verhindert.

Obwohl die Differenzierungsabläufe der Lunge im Einzelnen unbekannt sind, gibt es Möglichkeiten, modulierend in diesen Prozess einzugreifen. Die Therapieansätze beruhen im Wesentlichen auf einer klinischen Studie, in der gezeigt wurde, dass Cortisongabe an die Mutter, bei drohender Frühgeburt, zur Induktion der Lungenreifung beim menschlichen Fetus führt (Liggins et al. 1972). Heute gehört die Cortisongabe an die Mutter zur Standardtherapie bei drohender Frühgeburt, obwohl die genauen molekularen Mechanismen noch immer ungeklärt sind.

Versuche, eine monoklonale Typ II- Pneumozytenkultur durch Corticoide zur SF- Produktion anzuregen, zeigten eindeutig, dass Corticoide keinen direkten Effekt auf die SF- Produktion haben. Die Effekte finden demnach über das Mesenchym vermittelt statt.

Barry T. Smith postulierte daher 1979 die Existenz eines Faktors, des so genannten Fibroblasten- Pneumozyten- Faktors (FPF). Es handelt sich dabei um einen Botenstoff, der während der späten Fetalzeit vom Mesenchym - den Lungenfibroblasten - produziert und an die Umgebung abgegeben wird. Dieser Faktor wird über Glucocorticoide reguliert und steuert so die Surfactant- Biosynthese in den Typ II- Pneumozyten (Smith 1979).

Geht man davon aus, dass die Lungenreifung über Botenstoffe wie FPF vermittelt und außerdem durch Steroidhormone reguliert wird, stellt sich die Frage nach den Regulationsmechanismen. Diese können über allgemeine Wachstumsfaktoren vermittelt ablaufen. Beispielsweise konnte bei der Ratte für den Transforming- Growth- Faktor $\beta 3$ (TGF- $\beta 3$) eine cortisonabhängige Regulation auf mRNA- Ebene gezeigt werden. Damit stellt das TGF- $\beta 3$ - Gen ein Kandidatengen für FPF dar. Andererseits führte eine Erhöhung der TGF- $\beta 3$ - Konzentration im Medium einer Pneumozytenkultur nicht zu einer Epitheldifferenzierung, woraus geschlossen werden muss, dass die Induktion der Surfactant-Produktion noch über andere Mechanismen reguliert wird (Wang et al. 1995). Ebenfalls wurde für Lungenfibroblasten bei Ratten beschrieben, dass eine Regulation der DNA- Synthese durch TGF- β über eine Herabregulation von IGF-BP-3 stattfindet. Wie TGF- β können auch andere Faktoren z.B. KGF (Keratinocyte Growth Faktor), EGF (Epidermal Growth Faktor) oder Cytokine über eine Regulation der IGF- Bindungsproteine die DNA- Synthese in Lungenfibroblasten beeinflussen (Price 1999). Damit werden die Gene des IGF- Wachstumsfaktor- Systems ebenfalls zu interessanten Kandidatengenen für FPF.

In dieser Arbeit sollen daher die folgenden Wachstumsfaktoren sowie die entsprechenden Rezeptoren und Bindungsproteine aus dem IGF- System auf ihre Regulierbarkeit durch die natürlichen Steroidhormone Cortisol, Dihydrotestosteron und Estradiol beim Menschen untersucht werden:

- IGF-I, IGF-II
- IGF-I Rezeptor, IGF-II Rezeptor
- IGF-BP-2, IGF-BP-3

Als Modell wurde eine Zellkultur humaner fetaler Lungenfibroblasten gewählt. Nach Inkubation der Zellen mit unterschiedlichen Hormonkonzentrationen über unterschiedlich lange Zeiträume wurde die RNA aus den Zellen isoliert und mit qualitativen und quantitativen Methoden analysiert. Es soll so ein Beitrag zur Aufklärung der Regelmechanismen bei der

Lungenreifung auf transkriptionaler Ebene geleistet werden. Ein besseres Verständnis dieser Abläufe kann langfristig zu neuen Therapieansätzen bei der Behandlung sehr unreifer Frühgeborener führen.

1.1 Das System der Insulin- Like- Growth- Factors

Die Wirkungen und Regelmechanismen des IGF- Systems sind vielfältig und komplex. Daher soll im Folgenden ein Überblick zeigen, was bisher bekannt ist, und warum dieses Wachstumsfaktorsystem für die Lungenentwicklung interessant ist.

Das IGF- System besteht aus IGF-I, IGF-II, zwei IGF- Rezeptoren (IGF-I Rezeptor und IGF-II Rezeptor), sowie wenigstens sechs Bindungsproteinen (IGF-BP-1 bis IGF-BP-6).

Die Wirkungsweise dieser Wachstumsfaktoren ist als auto-, para- und endokrin beschrieben. Sie werden durch hormonelle und allimentäre Faktoren beeinflusst. Über ihr Zusammenspiel ist bisher relativ wenig bekannt. Ihnen kommt eine wichtige Rolle beim Wachstum und bei Differenzierungsvorgängen zu (Weimann u. Kiess 1990, Lee 2001).

1.1.1 IGF-I und IGF-II

IGF-I wird in hohen Konzentrationen erst postnatal gefunden. Daher wird IGF-I eine wichtige Rolle bei Wachstums- und Differenzierungsvorgängen nach der Geburt zugeschrieben (Rotwein 1986, Rotwein 1991). Der IGF-I- Spiegel ist abhängig vom Wachstumshormonspiegel und nimmt nach der Geburt stetig zu. In der Pubertät kommt es zum höchsten Anstieg des IGF-I- Spiegels. Dieser ist abhängig vom Anstieg der Sexualhormone (Weimann und Kiess 1990).

IGF-II ist der vorherrschende Wachstumsfaktor in fetalen Geweben (Moats- Staats et al. 1995, Braulke et al. 1996). Er gilt als das Pendant zu IGF-I während der Fetalentwicklung (de Pagter- Holthuizen et al. 1988, de Pagter- Holthuizen et al. 1989).

Für die Fetalzeit wird vor allem eine para- und autokrine Wirkungsweise der Wachstumsfaktoren angenommen, da IGF zwar in vielen Geweben gebildet wird, im Serum aber nur in geringer Menge vorkommt (Weimann und Kiess 1990, Melnick et al. 1996).

Zur Aufklärung der Funktion von IGF-I und IGF-II wurden in Tierversuchen durch so genanntes „Gene- Targeting“ einzelne Gene gezielt inaktiviert. Versuche an Mäusen, bei denen das IGF-II- Gen inaktiviert wurde, konnten zeigen, dass diese Tiere

wachstumsretardiert waren, jedoch ansonsten funktionsfähige und differenzierte Organe aufwiesen (DeChiara et al. 1990). Bei Inaktivierung des IGF-I- Gens waren die Mäuse nicht lebensfähig. Sie starben kurz nach der Geburt an respiratorischem Versagen. Histologische Untersuchungen zeigten, dass die Lungen dieser Tiere atelektatisch waren und weniger Alveolarsepten aufwiesen, das heißt, sie waren undifferenziert (Powell- Braxton et al. 1993).

1.1.2 Die IGF- Rezeptoren

Die Effekte der Wachstumsfaktoren erfolgen rezeptorvermittelt. Es sind zwei spezielle Rezeptoren für IGF beschrieben. Zum einen der IGF-I Rezeptor, der strukturell dem Insulinrezeptor (IR) ähnelt und vor allem mit IGF-I interagiert. Er kommt als Oberflächenrezeptor vor. Zum anderen der IGF-II Rezeptor. Der IGF-II Rezeptor ist identisch mit dem Mannose-6-Phosphat Rezeptor. Sein Vorkommen wird sowohl intrazellulär als auch im Serum beschrieben (Weimann und Kiess 1990).

Durch gezielte Setzung von Gendefekten konnten auch die Funktionen der IGF- Rezeptoren näher geklärt werden. So konnten ähnliche Beobachtungen wie bei Inaktivierung des IGF-I- Gens auch bei Inaktivierung des IGF-I Rezeptor- Gens bei der Maus gemacht werden. Diese Tiere starben ebenfalls wenige Minuten nach der Geburt an akutem respiratorischen Versagen. Als möglicher weiterer Grund für die Unfähigkeit zu atmen kommt neben dem Mangel an Surfactant bei unreifen Lungen auch eine Hypoplasie der Atemmuskulatur, die ebenfalls bei IGF-I Rezeptordefekt auftritt, in Frage (Liu et al. 1993).

Der IGF-I Rezeptor spielt auch bei Reparaturvorgängen eine wichtige Rolle. Seine Expression wird unter anderem durch Entzündungsmediatoren und Cytokine reguliert. Eine IGF-I Wirkung wird nahezu ausschließlich über den IGF-I Rezeptor vermittelt. Er moduliert IGF- Wirkungen, z.B. die Mitosestimulation, die Förderung der Migration und die Hemmung der Apoptose (Chatty et al. 2004). Die Wirkung von IGF-II wird sowohl über den IGF-I Rezeptor als auch über den Insulinrezeptor (IR) vermittelt (Liu et al. 1993).

In fetalem und neoplastischem Gewebe konnte eine Splicevariante des IR identifiziert werden (Butler und LeRoith 2001). So stimulieren die IGF das fetale Wachstum über den IGF-I Rezeptor und den IR. Über den IGF-II Rezeptor vermittelt, findet vor allem eine Inhibition der Wirkung von IGF-II auf das fetale Wachstum statt (Butler und LeRoith 2001).

1.1.3 Die IGF- Bindungsproteine

IGF-I und IGF-II zirkulieren an Trägerproteine gebunden, von ihnen sind bisher sechs als so genannte Bindungsproteine beschrieben. Die Bindungsproteine spielen eine Rolle bei der Regulation der Bioaktivität der IGF.

Die Funktion der Bindungsproteine besteht darin, durch Bindung der IGF ihre Zirkulationshalbwertszeit zu erhöhen, und sie über den Blutkreislauf in den gesamten Organismus zu transportieren. Darüber hinaus besitzen die IGF-BP die Fähigkeit, die IGF-Wirkung an den Zellen zu modulieren (Lee et al. 1990, Price 1999). Vor allem auf der posttranskriptionalen Ebene werden die Wirkungen von IGF-I und IGF-II durch die IGF-Bindungsproteine reguliert (Bräulke 1996, Price 1999). Darüber hinaus ist bekannt, dass die Expression der IGF-BP beispielsweise durch Hormone, Cytokine oder Wachstumsfaktoren reguliert wird (Price 1999).

IGF-BP-1 kommt in hoher Konzentration in der Plazenta und in der Amnionflüssigkeit vor. IGF-BP-2 findet sich vor allem in Liquor oder im Gehirn. Ihm wird eine wichtige Rolle bei der Differenzierung und Regeneration von Nervengewebe zugeschrieben. Außerdem ist IGF-BP-2 bei fetalen Ratten das vorherrschende Bindungsprotein (Lamson et al. 1991).

Das vorherrschende Bindungsprotein in humanen fetalen Zellen ist IGF-BP-3. Es liegt sowohl in freier Form, als auch an Membranen gebunden vor. Abhängig von der Form, kann es die IGF- Effekte entweder fördern oder hemmen. Bei wachstumsretardierten Rhesusaffen konnte ein umgekehrt proportionales Verhältnis von IGF-I und IGF-BP-3 nachgewiesen werden (Lee et al 1990). IGF-BP-3 zeigt eine starke Abhängigkeit seiner Serumkonzentration vom Wachstumshormon. Bei klinischem Verdacht auf Wachstumshormonmangelsyndrome wird es daher zum Screening herangezogen. Ihm kommt eine wichtige Rolle bei Wachstum und Differenzierung zu (Weimann und Kiess 1990).

1.2 Faktoren, die klinisch einen Einfluss auf die Lungenreifung haben

Ein wichtiger Faktor, der die Lungenreifung beeinflusst, ist das Cortisol. Auch nach Einführung der Lungenreifungsinduktion durch Cortisongabe fällt auf, dass es immer noch zum Atemnotsyndrom bei Frühgeborenen kommt.

Es hat sich gezeigt, dass männliche Frühgeborene von dieser Therapie weniger profitierten. Zudem hat man beobachtet, dass weibliche Frühgeborene deutlich bessere

Überlebenschancen haben, als männliche. Zudem erkranken Mädchen seltener am Atemnotsyndrom als Jungen.

Ein Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Feten ist der in männlichen Feten höhere Testosteronspiegel. Dieser wird als mögliche Ursache der bei männlichen Feten verzögerten Lungenreifung diskutiert. Darüber hinaus konnte an humanen Lungenorgankulturen gezeigt werden, dass ein Grund für die verzögerte Lungenreifung tatsächlich endogen gebildete Androgene sind. Die hemmende Wirkung der Androgene auf die FPF- Synthese wird über einen Androgenrezeptor vermittelt. Durch ein Antiandrogen, welches den Androgenrezeptor blockiert, konnte der hemmende Effekt aufgehoben werden. Dies beweist, dass der Effekt rezeptorvermittelt sein muss (Torday 1989 und 1990).

Darüber hinaus wird ein Östrogeneffekt auf die Lungenreife diskutiert.

Es konnte an Organkulturen von Rattenlungen gezeigt werden, dass steigende Östrogenkonzentrationen im Medium zu einer Differenzierung der Epithelzellen und zur Vermehrung der Zellkontakte zwischen Mesenchym und Epithel führen (Adamson et al. 1990).

Andere Beobachtungen haben gezeigt, dass Kinder von Müttern mit einem während der Schwangerschaft schlecht eingestellten Diabetes mellitus ebenfalls häufiger am Atemnotsyndrom leiden, als Kinder gesunder Mütter oder von Müttern mit einem gut eingestellten Diabetes mellitus. Dies führt zu der Hypothese, dass eine Hyperinsulinämie, wie sie bei diesen Feten vorliegt, sich ebenfalls hemmend auf die Lungenreifung auswirkt.

Alle diese Beobachtungen führen zu der These, dass weitere hormonelle aber auch allimentäre Faktoren die Lungenreifung beeinflussen.

1.3 Die Rolle des IGF- Systems bei der Lungenentwicklung

Nach dem bisherigen Forschungsstand ist es wahrscheinlich, dass dem IGF- System eine Rolle bei der Lungenentwicklung und –reifung zukommt. Ob dies wirklich so ist, und wie die regulativen Mechanismen ablaufen, ist bisher nicht geklärt.

Für diese These spricht die Regulierbarkeit der IGF durch Steroidhormone, sowie die Abhängigkeit von Ernährungsfaktoren (Weimann und Kiess 1990, Butler und LeRoith 2001).

Es wurde beschrieben, dass die Zugabe von Dexamethason in einer Typ- II- Pneumozyten-Kultur zu einer Hemmung der Replikation und zu einer Induktion von IGF-BP-2 führt, sowie zu einer vermehrten Expression von IGF-II und IGF-II Rezeptor. Versuche an immortalisierten Rattenlungenfibroblasten haben gezeigt, dass eine Zugabe von Dexamethason zum Medium ebenfalls zu einer Inhibition der Replikation führt. Durch Northernblotanalyse wurde die Expression einer IGF-II mRNA nachgewiesen (Mouhieddine 1996).

Durch in situ- Hybridisationstechnik konnte anhand von Mauslungen gezeigt werden, dass die diversen mRNA des IGF- Systems unterschiedlich in den verschiedenen Geweben der Lunge verteilt sind. Es fand sich IGF-BP-2 mRNA vor allem in den Epithelzellen, in geringeren Mengen konnte sie jedoch auch über die gesamte Embryonalentwicklung in den mesenchymalen Geweben gefunden werden (Schuller et al. 1995).

So scheint der Achse IGF-II, IGF-II Rezeptor und IGF-BP-2 bei den regulativen Abläufen eine bedeutende Rolle innerhalb des IGF- Systems zuzukommen. Ebenso scheint die regulative Achse über IGF-I, IGF-I Rezeptor und IGF-BP-3 einen Einfluss auf die Entwicklung und Reifung der Lunge zu haben (Chatty et al. 2004). Wie diese Regelmechanismen aussehen, ist jedoch immer noch weitgehend unbekannt.

Reguliert werden diese Faktoren offenbar über hormonelle Einflüsse.

1.4 Fragestellung

Aus den beschriebenen Daten ergeben sich folgende Fragen, die im Rahmen dieser Arbeit beantwortet werden sollen:

1. Lässt sich mRNA der Wachstumsfaktoren des IGF- Systems in einer Kultur von humanen fetalen Lungenfibroblasten nachweisen?
2. Wird die Expressionshöhe der Wachstumsfaktor- mRNA in humanen fetalen Lungenfibroblasten durch Steroidhormone reguliert?

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Die Zellkultur wurde unter sterilen Arbeitsbedingungen angelegt. Alle Arbeiten erfolgten in einem Zellkulturlabor unter einer sterilen Werkbank (Fa. Zapf- Instruments, Sarstedt, Deutschland). Die Medien wurden vor Verwendung im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt.

Es wurde die humane Lungenfibroblasten- Zelllinie ATCC CRL 7810, männlich, kaukasisch, 20. Gestationswoche verwendet, die uns von Herrn Dr. M. Tenniswood Ph.D, W.A. Cell Service Center Lake Placid, N.Y. USA überlassen wurde.

Zunächst erfolgte die Anzucht der Zellen in Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture-F12 Ham (DMEM-F12; Fa. Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) pH 7,3 mit Zusatz von 10% Fetal Calv Serum (FCS; Fa. PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland), 1% Penicillin- Streptomycin- Gemisch (Fa. Sigma- Aldrich) und 0,02% Testosteron (Fa. Sigma- Aldrich). Die Zellen wurden bei 37°C und unter 4% Kohlendioxydatmosphäre (Brutschrank; Fa. Heraeus, Hanau, Deutschland) inkubiert, bis sie eine Konfluenz von 100% erreicht hatten. Nach 48 und 72 Stunden erfolgte ein Medienwechsel.

Die Untersuchung der Hormoneinflüsse erfolgte in serumfreiem Medium Fibroblast Basal Medium (prf) (Fa. Promo Cell, Heidelberg, Deutschland). Der Einfluss folgender Hormone wurde untersucht:

- Cortisol (Hydrocortisone; Fa. Sigma- Aldrich)
- Östradiol (β - Estradiol; Fa. Sigma Aldrich)
- Dihydrotestosteron (DHT; Fa. Sigma- Aldrich)

Die Konzentrationen der Hormone umfassten einen Bereich, der von unterhalb der physiologischen Konzentration beim Menschen bis oberhalb physiologisch vorkommender Konzentrationen reichte. Aus dieser Spanne wurden jeweils fünf Konzentrationen ausgewählt, um den gesamten Bereich abzudecken. Für jeden Ansatz wurde eine Negativprobe ohne Hormonzusatz unter ansonsten identischen Bedingungen mitgeführt.

Die Cortisolwerte in der 28.-31. Schwangerschaftswoche liegen zwischen 140-410 nmol/l (Stahl et al. 1979).

Bei Frühgeborenen finden sich höhere Cortisolwerte. Die höchsten Werte wurden in der 24.-27. Schwangerschaftswoche im Nabelschnurblut gemessen (Topper et al. 1992).

Folgende Konzentrationen wurden ausgewählt:

50 nmol/l 250 nmol/l 500 nmol/l 750 nmol/l 1000 nmol/l

Estradiol

Die physiologische Konzentration bei Knaben bis zum 10. Lebensjahr liegt zwischen 0,018 und 0,04 nmol/l (Behrman et al. 2000). Folgende Konzentrationen wurden ausgewählt:

0,01nmol/l 0,1 nmol/l 10 nmol/l 1µmol/l 10µmol/l

DHT

Die physiologische Konzentration für Knaben bis zum 10. Lebensjahr liegt unter 0,1nmol/l (Behrman et al. 2000). Folgende Konzentrationen wurden ausgewählt:

0,1 nmol/l 0,5 nmol/ 1 nmol/l 5 nmol/l 10 nmol/l

Die Zellen wurden in serumfreiem Medium unter Hormonzusatz inkubiert. Eine RNA-Isolierung erfolgte nach 2/ 4/ 12/ 24/ 48/ 72 Stunden.

Bei einer Konfluenz von 100% wurden die Zellen mit 2,5ml/175cm² 0,5% Trypsin (Fa. Linaris, Wertheim, Deutschland) vom Flaschenboden abgelöst. Das Trypsin wurde mit serumhaltigem Medium neutralisiert, wenn alle Zellen sich vom Boden gelöst hatten. Die Suspension wurde einmalig bei 800x g zentrifugiert. (Zentrifuge Universal 16A; Fa. Hettich, Tuttlingen, Deutschland) Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in serumfreiem Medium resuspendiert. In Kulturflaschen wurde auf 37°C vorgewärmtes, serumfreies Medium vorgelegt und mit der Zellsuspension angeimpft.

Die Menge der für die Aussaat verwendeten Zellen ergab sich aus der Wachstumsgeschwindigkeit, und war deshalb für jede Zeit unterschiedlich. Angestrebt wurde eine Konfluenz bei der Ernte von 80% (entspricht einer Zellzahl von etwa 3,5*10⁶).

Nach Vorversuchen wurden die Flaschen wie folgt beimpft:

- 24 Stunden 2,6*10⁶ Zellen/ 175cm² entspricht 1,48*10⁴ Zellen/ cm²
- 48 Stunden 1,6*10⁶ Zellen/ 175cm² entspricht 0,91*10⁴ Zellen/ cm²
- 72 Stunden 0,8*10⁶ Zellen/ 175cm² entspricht 0,46*10⁴ Zellen/ cm²

Für die Versuchsbedingungen nach zwei, vier und zwölf Stunden wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 60-80% mehrfach mit im Wasserbad vorgewärmter phosphat- gepufferter Salzlösung (PBS pH 7,2; Apotheke der Medizinischen Universität zu Lübeck) gewaschen und anschließend mit ebenfalls vorgewärmtem serumfreiem Medium, entsprechend der Versuchsanordnung mit oder ohne Hormonzusatz, für die angegebene Zeit inkubiert.

Es ergaben sich hier, wie in Vorversuchen ermittelt, ungefähre Zellzahlen bei Versuchsbeginn von:

- 2 Stunden $3,1 \cdot 10^6$ Zellen/ 175cm^2 entspricht $1,8 \cdot 10^4$ Zellen/ cm^2
- 4 Stunden $2,9 \cdot 10^6$ Zellen/ 175cm^2 entspricht $1,6 \cdot 10^4$ Zellen/ cm^2
- 12 Stunden $1,2 \cdot 10^6$ Zellen/ 175cm^2 entspricht $0,7 \cdot 10^4$ Zellen/ cm^2

Im Gegensatz zu den längeren Zeiten erfolgte für diese Zeiten keine Passage in neue Kulturflaschen.

2.2 RNA- Isolierung

Die RNA- Isolierung erfolgte ebenfalls unter sterilen Bedingungen an einem speziellen RNA- Arbeitsplatz. Alle verwendeten Lösungen und Materialien waren RNase- frei, oder wurden durch eine Spezialbehandlung RNase- frei gemacht (Maniatis et al. 1989).

Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurde die gesamt- RNA aus den Lungenfibroblasten isoliert.

Die Isolierung erfolgte regelmäßig bei einer Zellkonfluenz von ca. 80% (ca. $3,5 \cdot 10^6$ Zellen) und wurde mit dem RNeasy Midi Kit, (Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland) nach dem im Handbuch aufgezeichneten Protokoll (RNeasy Midi Handbook 2/97) modifiziert durchgeführt.

Zum Schutz der RNA vor Degradation wurde der im Kit enthaltene Lysispuffer mit 14,5mM β -Mercaptoethanol (10 μ l/ml) (Fa. Sigma- Aldrich) versetzt. Zur Lyse der adhärenen, mehrfach mit PBS gewaschenen Zellen wurden 4ml Lysispuffer/175 cm^2 Kulturflasche eingesetzt. Der Zelldetritus wurde mechanisch mit Zellschabern (Fa. Falcon, Heidelberg, Deutschland) vom Flaschenboden abgelöst, das Lysat mit Hilfe steriler Einmalpipetten (Fa. Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland) in sterile und RNase freie Reaktionsgefäße überführt, gemischt und durch auf- und abziehen in eine Spritze mit Kanüle homogenisiert.

Zur weiteren Aufarbeitung der RNA wurde das Zellysat mit einer Volumeneinheit Ethanol 70% (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) versetzt.

Die im Kit enthaltenen Chromatographiesäulen wurden mit 3,8ml Lysat beladen und bei 4000x g zentrifugiert.

Nachdem das gesamte Zellysat über die Säule gelaufen war, wurde die Säule mit 3,8ml RW-1 Puffer aus dem Kit (RNeasy Midi Kit; Fa. Qiagen) beladen und bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. In zwei weiteren Waschschrritten wurden die Säulen zweimal mit 2,5ml RPE-Puffer aus dem Kit (RNeasy Midi Kit; Fa. Qiagen) beladen und zentrifugiert. Nach dem ersten Schritt erfolgte eine vierminütige Zentrifugation bei 4000x g, nach dem zweiten Schritt folgte eine achtminütige Zentrifugation bei 4000x g. Im nächsten Schritt wurde die RNA zweimal mit jeweils 230µl RNase- freiem Wasser durch Zentrifugation über 5 Minuten bei 4000x g aus der Säule eluiert.

Das Eluat (400µl) wurde vollständig in 1,5ml fassende RNase- freie Reaktionsgefäße (Fa. Sarstedt) überführt.

Um die Konzentration zu erhöhen, schloss sich eine Fällung der RNA an:

Die RNA wurde mit 1/10 Volumeneinheit (das entspricht 40µl) Na-Acetat- Lösung 10% (Fa. Merck) und mit 3 Volumeneinheiten (das entspricht 1200µl) eiskaltem Ethanol 100% (Fa. Merck) versetzt und bei -20°C über 12 Stunden gefällt.

Nach der Fällung wurden die Proben in der Hochgeschwindigkeitszentrifuge (Zentrifuge 5410; Fa. Eppendorf- Netheler- Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland) bei 0-4°C und 5000x g für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde vorsichtig unter Verwendung eines RNase-freien Zellstoffs getrocknet. In 20µl RNase- freiem Wasser wurde die RNA resuspendiert.

Für die anschließenden Qualitätskontrollen wurde 1µl RNA in einem neuen, RNase- freien 1,5ml Reaktionsgefäß mit 79µl RNase- freiem Wasser im Verhältnis 1:80 verdünnt, sowie ein Aliquot von 1µl RNA unverdünnt in ein separates Reaktionsgefäß überführt.

Die Original- RNA sowie die beiden Aliquots wurden bei -80°C bis zur weiteren Analyse gelagert.

2.3 RNA- Analyse

Die Konzentration der gewonnenen gesamt- RNA kann durch photometrische Messung der Absorption bei 260nm bestimmt werden. Dafür wurde eine 1:80 Verdünnung der RNA in RNase- freiem 0,1% DEPC- Wasser (Diethylpyrocarbonat; Fa. Sigma- Aldrich) gegen DEPC- Wasser bei einer Wellenlänge von 260nm gemessen (Photometer DU-600; Fa. Beckmann Instruments GmbH, München, Deutschland).

Die Konzentration für die Gesamt- RNA berechnet sich nach folgender Formel:

$$40 * A_{260nm} * \text{Verdünnungsfaktor (80)}.$$

Es ergibt sich die Konzentration der RNA in $[\mu\text{g}/\mu\text{l}]$.

Um die Reinheit der RNA zu überprüfen, wurde ebenfalls eine photometrische Meßmethode verwendet. Es wurden die Absorptionen bei den Wellenlängen 260nm und 280nm ins Verhältnis gesetzt.

Die Ratio A_{260nm} / A_{280nm} erlaubt eine orientierende Aussage über eine mögliche Kontamination mit Proteinen oder anderen UV- absorbierenden Kontaminanten. Allerdings wird dieser Quotient A_{260nm} / A_{280nm} unter anderem durch den pH- Wert beeinflusst, so dass exakte Bestimmungen nur in gepufferten Lösungen (z.B. 10nM Tris- Cl) möglich sind.

Unter solchen Bedingungen hat reine RNA eine Ratio A_{260nm} / A_{280nm} von 1,8 bis 2,1.

Die Integrität der RNA wurde durch elektrophoretische Auftrennung in einem 1,5%igen Agarose- Formaldehydgel und Darstellung der RNA mit Ethidiumbromid (Fa. Merck) nachgewiesen.

Durch das im Gel enthaltene Formaldehyd wird die RNA denaturiert. Auf dem Gel zeigt sich ribosomale RNA, die als ein Qualitätsmarker für die gesamt- RNA herangezogen wird.

Ethidiumbromid ist ein polyzyklischer, heteroaromatischer, fluoreszierender Farbstoff mit positiver Ladung. Aufgrund dieser Eigenschaften kann er Bindungen mit Nukleinsäuren eingehen, indem er zwischen den Basenpaaren der Doppelhelix interkaliert. Die mit Ethidiumbromid angefärbten Nukleinsäuren können durch Anregung mit UV- Licht der Wellenlängen 245nm, 203nm oder 366nm sichtbar gemacht werden.

Es wurde in Elektrophoresekammern (Fa. AGS GmbH, Heidelberg, Deutschland), die zuvor durch eine Spezialbehandlung von RNasen befreit wurden (Maniatis 1989), ein 1,5% Agarosegel (Agarose; Fa. Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland) mit Formaldehydzusatz (Formaldehyd 37% pH 4,2; Fa. Merck) mit den Abmessungen 12,0cm*14,0cm*0,5cm gegossen. Das Gel wurde nach dem im Anhang aufgeführten Rezept hergestellt.

1µl der unverdünnten RNA wurde mit 12,5µl Probenpuffer (Herstellung im Anhang) und 0,75µl Ethidiumbromid (1g/l) gemischt und für 15 Minuten bei 65°C denaturiert.

Zusätzlich zu den Proben wurden in der Elektrophorese zwei RNA- Marker mitgeführt, die identisch zu den Proben vorbereitet und behandelt wurden. Dies sind:

RNA Ladder 0,24- 9,5kb (Gibco BRL)

RNA Längenstandard II 1,5- 6,9kb (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)

Nach einem Elektrophoresenlauf bei 80V, 400mA in 1x MOPS- Puffer (siehe Anhang) über 75 Minuten wurden die angefärbten Banden unter UV- Licht bei einer Wellenlänge von 254nm visualisiert und auf Polaroidfilm (Polaroid 667) fotografiert.

2.4 Spezifische Primer für die PCR

Um die zu untersuchenden Kandidatengene nachzuweisen, wurden spezielle Primer entworfen. Folgende Kriterien wurden von den Primern erfüllt:

- GC- Gehalt zwischen 50 und 60%
- Schmelztemperatur zwischen 50°C und maximal 80°C
- hohe 5' versus 3'- Stabilität

Die unter Verwendung der Primer amplifizierten Sequenzen überspannten mindestens ein Intron auf der DNA.

Die Primer wurden auf ihre Spezifität überprüft. Alle Primer wurden von der Firma Metabion hergestellt (Fa. Metabion, Martinsried, Deutschland).

Die einzelnen Sequenzen der Primer, jeweils der Vorwärtsprimer (sense) und der Rückwärtsprimer (antisense), sowie die Schmelztemperaturen T_m sind im folgenden aufgelistet:

IGF-I sense: 5'- GAT GCA CAC CAT GTC CTC CT -3' Tm 59,4°C

Position 251 bis 260 des menschlichen IGF-I Gens

IGF-I antisense: 5'- CAA TCT CCC TCC TCC TCT GCT CT- 3' Tm 59,4°C

Komplementär zu Position 700 bis 729 des menschlichen IGF-I Gens

IGF-II sense: 5'- ATG GGA ATC CCA ATG GGG AAG- 3' Tm 59,8°C

Position 553 bis 571 des menschlichen IGF-II Gens

IGF-II antisense: 5'- GAA GAA CTT GCC CAC GGG GAT- 3' Tm 61,8°C

Komplementär zu Position 874 bis 894 des menschlichen IGF-II Gens

IGF-IR sense: 5'- CAT CCG CAA CGA CTA TCA GC- 3' Tm 59,4°C

Position 159 bis 178 des menschlichen IGF-IR Gens

IGF-IR antisense: 5'- GGT GGC AGC ACT CAT TGT TC- 3' Tm 59,4°C

Komplementär zu Position 723 bis 742 des menschlichen IGF-IR Gens

IGF-IIR sense: 5'- GCA GCA GGA AGA TAC CAC AA- 3' Tm 57,3°C

Position 1327 bis 1346 des menschlichen IGF-IIR Gens

IGF-IIR antisense: 5'- GCC ATG ACC ACA ATC ATC AC- 3' Tm 57,3°C

Komplementär zu Position 1853 bis 1872 des menschlichen IGF-IIR Gens

IGF-BP-2 sense: 5'- ATG AAG GAG CTG GCC GTG TT- 3' Tm 59,4°C

Position 679 bis 698 des menschlichen IGF-BP-2 Gens

IGF-BP-2 antisense: 5'- AAG AGA TGA CAC TCG GGG TC- 3' Tm 59,4°C

Komplementär zu Position 1033 bis 1052 des menschlichen IGF-BP-2 Gens

IGF-BP-3 sense: 5'- GCT AAA GAC AGC CAG CGC TA- 3' Tm 59,4°C

Position 673 bis 691 des menschlichen IGF-BP-3 Gens

IGF-BP-3 antisense: 5'- ACT CAC ACA CCA GCA GAA GC- 3' Tm 59,4°C

Komplementär zu Position 911 bis 930 des menschlichen IGF- BP-3 Gens

Die Sequenzen wurden mit Hilfe des Internets unter www.ncbi.nlm.nih.gov mit den Datenbanken: Non- redundant GenBank, EMBL, DDBJ und PDB abgeglichen.

2.5 RT- PCR

Das Prinzip der RT- PCR besteht darin, eine RNA in eine einzel- oder doppelsträngige cDNA umzuschreiben. Hierfür verwendet man Reverse Transcriptasen Enzyme, die aus Retroviren gewonnen werden.

Die PCR (Polymerase chain reaction) wurde erstmals von Mullis und Faloona als Methode zum Nachweis bekannter Gene in sehr geringer Konzentration beschrieben (K. Mullis und F. Faloona 1987).

Das Prinzip besteht in einer exponentiellen Vervielfältigung eines von den Primern flankierten Genomabschnittes.

RT- Schritt

Für den RT- Schritt der Reaktion wurde das Enzym Superscript-II (Fa. Gibco BRL) RNase-H Reverse Transcriptase (ein Enzym, das aus dem Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) gewonnen wird) verwendet.

Es handelt sich um ein Enzym mit einer RNA-abhängigen DNA- Polymerase- Aktivität, die eigentliche Reverse Transcriptase. RNase-H ist eine Exoribonuklease, die RNA aus DNA/RNA- Hybridsträngen abbaut, jedoch keinen Effekt auf freie RNA hat.

Um mRNA in cDNA umzuschreiben gibt es verschiedene Möglichkeiten. Es wurde ein spezieller Primer verwendet (oligo-dT Primer; Fa. Roche), um mRNA zu selektieren. Dieser Primer bindet an den Poly-A- Schwanz der mRNA.

Dieses „Priming“ war der eigentlichen PCR vorangestellt. Der Versuchsablauf war für alle in der PCR verwendeten Primer identisch:

1µg gesamt RNA wurde in einem Volumen von 10µl DEPC- Wasser eingesetzt.

Es wurde 1µl oligo-dT Primer (50µmol/l) zugegeben, gemischt und zentrifugiert.

Das Gemisch wurde für 10 Minuten bei 70°C denaturiert.

Anschließend erfolgte die Zugabe von 8µl des RT-Mix (Zusammensetzung und Pipettierschema im Anhang).

Bevor das Enzym Superscript-II zugegeben wurde, wurden die Proben für zwei Minuten bei 37°C gehalten.

Die RT- Reaktion lief anschließend bei 50°C für 30 Minuten ab (Thermocycler MJ Research; Fa. Biozym GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland).

PCR- Schritt (konventionelle PCR)

Die im vorausgegangenen Arbeitsschritt gewonnene, doppelsträngige cDNA wurde nun unverdünnt in die PCR mit den unterschiedlichen Primern eingesetzt.

Für jedes zu untersuchende Primerpaar wurden die optimalen Bedingungen in Vorversuchen ausgetestet. Es ergaben sich die Reaktionsansätze und PCR- Bedingungen wie folgt:

2.5.1 IGF I

Es wurde 1µl cDNA aus 1µg gesamt RNA eingesetzt. Das gesamte Reaktionsvolumen betrug 49,2µl. Das Reaktionsgemisch enthielt: 2mM dNTP (Fa. Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, Deutschland), 266,4µM sense Primer (Fa. Metabion), 334,7µM antisense Primer (Fa. Metabion), 50mM KCl (Fa. Merck), 20mM Tris (Fa. Sigma- Aldrich), 50µg/ml BSA (Fa. Sigma- Aldrich), 1,5mM MgCl₂ (Fa. Merck) pH: 9,0 und 1U Taq-Polymerase (Fa. Sigma Aldrich).

Die Reaktion erfolgte im Thermocycler (MJ Research; Fa. Biozym). Nach einem Startzyklus von 5 Minuten bei 94°C und zwei Minuten bei 72°C folgten 34 Zyklen mit 1 Minute 30 Sekunden bei 62°C, zwei Minuten bei 72°C und eine Minute 15 Sekunden bei 94°C. Die Reaktion wurde abgeschlossen mit 5 Minuten bei 72°C. Anschließend erfolgte die Abkühlung des Reaktionsgemisches auf 4°C.

2.5.2 IGF II

Es wurde 1µl cDNA aus 1µg gesamt RNA eingesetzt. Das gesamte Reaktionsvolumen betrug 49,2µl. Das Reaktionsgemisch enthielt: 2mM dNTP; 156,2µM sense Primer; 135,8µM antisense Primer; 50mM KCl; 20mM Tris; 50µg/ml BSA; 1,0mM MgCl₂ pH: 8,7 und 1U Taq-Polymerase.

Die Reaktion erfolgte im Thermocycler. Nach einem Startzyklus von 5 Minuten bei 94°C und zwei Minuten bei 72°C folgten 34 Zyklen mit 1 Minute 30 Sekunden bei 63°C, zwei Minuten bei 72°C und eine Minute 15 Sekunden bei 94°C. Die Reaktion wurde abgeschlossen mit 5 Minuten bei 72°C. Anschließend erfolgte die Abkühlung des Reaktionsgemisches auf 4°C.

2.5.3 IGF I Rezeptor

Es wurde 1µl cDNA aus 1µg gesamt RNA eingesetzt. Das gesamte Reaktionsvolumen betrug 49,2µl. Das Reaktionsgemisch enthielt: 2mM dNTP; 124,2µM sense Primer; 166,5µM

antisense Primer; 50mM KCl; 20mM Tris; 50µg/ml BSA; 1,5mM MgCl₂ pH: 9,0 und 1U Taq-Polymerase.

Die Reaktion erfolgte im Thermocycler. Nach einem Startzyklus von 5 Minuten bei 94°C und zwei Minuten bei 72°C folgten 34 Zyklen mit 1 Minute 30 Sekunden bei 57°C, zwei Minuten bei 72°C und eine Minute 15 Sekunden bei 94°C. Die Reaktion wurde abgeschlossen mit 5 Minuten bei 72°C. Anschließend erfolgte die Abkühlung des Reaktionsgemisches auf 4°C.

2.5.4 IGF II Rezeptor

Es wurde 1µl cDNA aus 1µg gesamt RNA eingesetzt. Das gesamte Reaktionsvolumen betrug 49,2µl. Das Reaktionsgemisch enthielt: 2mM dNTP; 146,3µM sense Primer; 186,5µM antisense Primer; 50mM KCl; 20mM Tris; 50µg/ml BSA; 1,5mM MgCl₂ pH: 9,0 und 1U Taq-Polymerase.

Die Reaktion erfolgte im Thermocycler. Nach einem Startzyklus von 5 Minuten bei 94°C und zwei Minuten bei 72°C folgten 34 Zyklen mit 1 Minute 30 Sekunden bei 55°C, zwei Minuten bei 72°C und eine Minute 15 Sekunden bei 94°C. Die Reaktion wurde abgeschlossen mit 5 Minuten bei 72°C. Anschließend erfolgte die Abkühlung des Reaktionsgemisches auf 4°C.

2.5.5 IGF-BP-2

Es wurde 1µl cDNA aus 1µg gesamt RNA eingesetzt. Das gesamte Reaktionsvolumen betrug 49,2µl. Das Reaktionsgemisch enthielt: 2mM dNTP; 269,9µM sense Primer; 137,1µM antisense Primer; 50mM KCl; 20mM Tris; 50µg/ml BSA; 1,0mM MgCl₂ pH: 8,7 und 1U Taq-Polymerase.

Die Reaktion erfolgte im Thermocycler. Nach einem Startzyklus von 5 Minuten bei 94°C und zwei Minuten bei 72°C folgten 34 Zyklen mit 1 Minute 30 Sekunden bei 59°C, zwei Minuten bei 72°C und eine Minute 15 Sekunden bei 94°C. Die Reaktion wurde abgeschlossen mit 5 Minuten bei 72°C. Anschließend erfolgte die Abkühlung des Reaktionsgemisches auf 4°C.

2.5.6 IGF-BP-3

Es wurde 1µl cDNA aus 1µg gesamt RNA eingesetzt. Das gesamte Reaktionsvolumen betrug 49,2µl. Das Reaktionsgemisch enthielt: 2mM dNTP; 116,9µM sense Primer; 155,3µM antisense Primer; 50mM KCl; 20mM Tris; 50µg/ml BSA; 1,5mM MgCl₂ pH: 8,3 und 1U Taq-Polymerase.

Die Reaktion erfolgte im Thermocycler. Nach einem Startzyklus von 5 Minuten bei 94°C und zwei Minuten bei 72°C folgten 34 Zyklen mit 1 Minute 30 Sekunden bei 59°C, zwei Minuten

bei 72°C und eine Minute 15 Sekunden bei 94°C. Die Reaktion wurde abgeschlossen mit 5 Minuten bei 72°C. Anschließend erfolgte die Abkühlung des Reaktionsgemisches auf 4°C.

Die Visualisierung der PCR- Produkte erfolgte (identisch für alle PCR- Proben) auf einem 1,5%igen Agarosegel in 1x TBE- Puffer (Tris- Borsäure- EDTA- Puffer).

16µl des PCR- Produktes wurden mit 4µl Bluestop- Puffer (Zusammensetzung siehe Anhang) gemischt und das Gel hiermit gleichmäßig beladen.

Der Elektrophoreselauf erfolgte in 1x TBE Laufpuffer nach einer Einlaufphase von 10 Minuten bei 80V, schließlich über eine Stunde bei einer Spannung von 100V.

Als Längenmarker wurde ein DNA- Marker (DNA- Ladder; Fa. Gibco BRL) verwendet, der identisch zu den PCR- Proben behandelt wurde. Anhand des Markers konnte die Größe des gefundenen PCR- Produktes abgeschätzt und so das Produkt identifiziert werden.

2.6 Klonierung der PCR- Produkte

Die Klonierung der PCR- Produkte erfolgte unter Verwendung des TA- Cloning- Kit (Fa. Invitrogen BV, Groningen, Niederlande). Im Kit enthalten sind der linearisierte Plasmidvektor pCRII, T4 DNA Ligase, SOC- Medium, E. coli Stamm INVαF sowie Puffer und Nukleotidmix für die Ligation und Transformation der Bakterien.

Das Prinzip besteht darin, dass ein PCR- Produkt mit Hilfe eines Vektors in Bakterien eingeschleust wird, in denen die Sequenz des PCR- Produktes vermehrt werden kann.

Bei dem Vektor handelt es sich um ein Plasmid, das im Kit in linearisierter Form vorliegt. An den Enden des offenen Plasmids befinden sich Sequenzüberhänge aus oligo- Desoxythymidin.

Diese T- Überhänge, oder „sticky- ends“ ermöglichen ein Einklonieren der PCR- Produkte.

Die bei der PCR eingesetzte Taq- Polymerase besitzt, aufgrund ihrer fehlenden Exonukleaseaktivität, die nicht- template- abhängige Eigenschaft, an die 3'- Enden der PCR- Produkte ein Desoxyadenosin anzuhängen. Die auf diese Weise entstehenden A- Überhänge ergeben ebenfalls „sticky- ends“, die an die T- Überhänge des Vektors binden.

Die optimale Menge des PCR- Produktes, die für die Klonierung benötigt wird, kann mit folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Xng PCR- Produkt} = (\text{Ybp PCR-Produkt}) \cdot (50\text{ng pCRII- Vektor}) / 3900\text{bp}$$

Die Größe 3900bp ergibt sich aus der Größe des Vektors.

Es ergibt sich hieraus ein molares Verhältnis von Vektor:Insert=1:1.

Das Gesamtvolumen des Ligationsansatzes beträgt 10 μ l und setzt sich wie folgt zusammen:

- entsprechend errechnete Menge PCR- Produkt
- 10xLigationspuffer 1 μ l
 (60mM Tris-HCl, pH 7,5; 60mM MgCl₂; 50mM NaCl; 1mg/ml BSA;
 70mM β - Mercaptoethanol; 1ml ATP; 20mM Dithiothreitol;
 10mM Spermidine)
- pCRII 2 μ l
 (25ng/ μ l in 10mM Tris-HCl; 1mM EDTA, pH 7,5)
- T4 DNA Ligase 1 μ l
 (4,0 Weiss units)

Der Ansatz wird vor Zugabe des Enzyms mit sterilem Wasser auf 9 μ l aufgefüllt.

Die Ligation läuft über Nacht bei 14°C ab.

Das PCR- Produkt und damit die zu klonierende Sequenz ist nun in das Plasmid integriert, und zwar an einer Stelle, an der das PCR- Produkt das β -Galactosidase- Gen unterbricht.

Die Sequenz des Plasmidvektors und die Lage des einklonierten Inserts sowie die verschiedenen Enzymschnittstellen des Vektors sind der Abbildung im Anhang zu entnehmen.

Für die Transformation wurden E. coli- Bakterien verwendet, die den lac- Repressor nicht exprimieren. Deswegen war eine Selektion auf galaktosehaltigem Medium ohne weitere Zusätze möglich.

Die Transformation erfolgte auf festen Nährböden aus LB- (Luria- Bertani) Medium (Gibco BRL), denen 100 μ g/ml Ampicilin (Fa. Roche) und 50 μ l/ml Kanamycin (Fa. Gibco BRL), sowie 40mg/ml X- Gal (Fa. Biomol, Hamburg, Deutschland) zugesetzt wurden.

Die E. coli- Bakterien (im Kit enthalten) wurden aufgetaut, und zu jedem Aliquot wurden 2 μ l β - Mercaptoethanol (0,5M) zugegeben. 5 μ l des Ligationsprodukts wurden mit den Zellen vermischt und für 30 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zellen für 30

Sekunden bei 42°C hitzegeschockt und sofort wieder für 2 Minuten auf Eis gestellt. Jedem Ansatz wurden nun 500µl SOC- Medium (im Kit enthalten) zupipettiert und eine Stunde bei 37°C und 225rpm im Zellschüttler (Typ TH-05; Fa. Gerhardt GmbH & Co KG, Königwinter, Deutschland) inkubiert.

Aus dem Reaktionsansatz wurden Aliquots von 50- 200µl auf LB- (Luria- Bertani) Medium-Agarplatten 1,5% (Agar select; Fa. Gibco BRL) mit Antibiotikazusätzen ausgestrichen. Die Zellen wurden mindestens 18 Stunden bei 37°C bebrütet.

Auf den Nährböden konnten nur Zellen wachsen, die ein Plasmid aufgenommen hatten, da nur diese Zellen gegen die dem Nährboden zugesetzten Antibiotika resistent waren.

Aufgrund einer Farbreaktion waren Zellen mit Plasmid, in welches das PCR- Produkt erfolgreich eingebracht werden konnte, von solchen zu unterscheiden, die ein selbstligiertes Plasmid ohne das PCR- Produkt aufgenommen hatten. Da das PCR- Produkt das lacZ- Gen unterbricht, haben Kolonien, die ein selbstligiertes Plasmid enthalten, in Gegenwart von X-Gal eine blaue Farbe. Die Zellklone mit erfolgreich einkloniertem PCR- Produkt haben eine weiße Farbe.

Die Ausprägung der Farbe hängt allerdings von der Größe des Inserts ab. Bei kleinen Inserts (<500bp) können die Kolonien hellblau sein, da das lacZ- Gen nicht ausreichend unterbrochen wird.

Um eine optimale Farbentwicklung zu erzielen, kann es nötig sein, die Zellen für 2-3 Stunden bei 4°C zu halten.

Einzelne Kolonien mit weißer Farbe wurden auf frischen Platten ausgestrichen und durch folgende Schritte analysiert:

- Isolation des Plasmids
- Restriktionsansatz
- Sequenzierung des Plasmids

Für eine Plasmidisolation wurden 2-5ml flüssiges LB- Medium mit Ampicillin- oder Kanamycinzusatz mit einigen Kolonien beimpft. Die Zellen wurden über Nacht inkubiert und die Plasmide mit dem Miniprep Kit Qiaprep spin (Fa. Qiagen) isoliert.

Die Präparation erfolgte nach dem im Handbuch enthaltenen Protokoll (QIAprep Miniprep Handbook 04/1998).

Das Prinzip beruht auf einer Bindung der Plasmide nach alkalischer Zellyse an ein Silica- Gel. Hierzu wird ein Puffer mit hohem Salzgehalt verwendet, wobei das pH- Optimum zwischen 7,0 und 8,5 liegt; dies erhöht die Selektivität der Bindung. Zellbestandteile sowie RNA werden in Waschschritten mit PBS- Puffer entfernt, und man kann die Plasmid- DNA in 10mM Tris- Cl- Puffer pH 8,5 oder in Wasser eluieren.

Die isolierten Plasmide wurden zur Sequenzierung an die Firma MWG- Biotech (Ebersberg, Deutschland) verschickt.

2.7 Restriktionsansatz und Analyse des Plasmids

Neben der kommerziellen Sequenzierung wurde das Plasmid mit Restriktionsenzymen geschnitten und das Ergebnis auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Dieses Verfahren ermöglicht einen Überblick darüber, ob das Insert großemäßig in dem erwarteten Bereich liegt und ob die gewählten Restriktionsenzyme geeignet sind, das Insert vollständig aus dem Plasmid zu schneiden.

Die Restriktionsenzyme müssen so gewählt werden, dass sie möglichst nahe dem Insert schneiden. Das Insert selbst darf keine entsprechende Restriktionsschnittstelle haben, um nicht zerschnitten zu werden.

Es wurde für alle Inserts das Enzym EcoR-I (Fa. Roche) gewählt, weil das Plasmid in relativer Nähe zum inklonierten Insert eine EcoR-I Schnittstelle hat (siehe Abbildung im Anhang). Keines der Inserts hatte seinerseits eine Erkennungssequenz für EcoR-I.

Für den Restriktionsansatz wurden 0,5µg des aus den E. coli isolierten Plasmids eingesetzt. Das Gesamtreaktionsvolumen betrug 10µl.

Es wurden 1µl des Enzyms EcoR- I (1U/µl) (Fa. Roche) und 1µl des beiliegenden 10x Puffers (2x KGB- Puffer; Fa. Roche) gemischt und der Restriktionsansatz auf ein Volumen von 10µl mit sterilem Wasser aufgefüllt.

Der Restriktionsverdau lief bei 37°C für 10 Stunden ab, es schlossen sich 5 Minuten bei 70°C zur Denaturierung des Enzyms an. Zum Schluss wurde der Ansatz auf 4°C abgekühlt.

Die Überprüfung der Restriktion erfolgte im Anschluss auf einem 1,5%igen Agarosegel in 1x TBE- Puffer. Die Proben wurden nach einer zehnminütigen Einlaufzeit bei 70V über 60 Minuten bei 90V aufgetrennt.

2.8 Northernblot

2.8.1 RNA- Gel für Northern- Blot

RNA kann mit Hilfe des Northernblot- Verfahrens an eine Nylonmembran (Hybond- N; Fa. Ammersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) gebunden und an sie fixiert werden. Es gibt verschiedene Blotverfahren, die alle auf dem gleichen Prinzip beruhen. Das von uns gewählte Verfahren ist ein Vakuum- Blotverfahren mit einer kommerziell erworbenen Blotapparatur (Vacu Gene XL; Fa. Ammersham Pharmacia Biotech) sowie zugehöriger Pumpe.

Zunächst wurde die RNA auf einem Agarose- Formaldehyd- Gel aufgetrennt.

Es wurde eine Gesamtmenge von 12µg RNA eingesetzt. Die Proben wurden 15 Minuten bei 65°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden zu jeder Probe 2,1µl Northern Ladepuffer (Samplebuffer) zugegeben und die Proben wurden gleichmäßig auf ein ca. 1- 1,5cm dickes 0,9%iges Agarosegel mit Zusatz von 2% Formaldehyd aufgebracht.

Die Auftrennung der Proben erfolgte elektrophoretisch. Die Proben liefen bei 10V ins Gel ein, dann erfolgte die Auftrennung bei 70V für 90 Minuten.

Die Blotapparatur besteht aus einer Kunststoffkammer mit einer porösen Deckplatte. An die Kammer wurde mit Hilfe einer Pumpe ein Vakuum von etwa 50mbar angelegt.

Auf die poröse Platte wurde zunächst die Nylonmembran, die etwas größer als das Gel zugeschnitten sein sollte, aufgelegt. Darüber wurde eine vorgefertigte Plastikmaske in Gelgröße gelegt. Das Gel wurde zum Schluss vorsichtig und exakt über der Plastikmaske platziert. Das Vakuum wurde angelegt.

Vor dem eigentlichen Blotvorgang wurde das Gel mehreren Waschschritten unterzogen:

- 10min DEPC- Wasser
- 10min alkalische Lösung (siehe Rezeptteil)
- 10min neutrale Lösung (100mM Tris- HCl)

Das Gel wurde jeweils mit den Lösungen überschichtet, anschließend wurden die Waschlösungen abpipettiert.

Der eigentliche Blotvorgang fand mit 20x SSC- Salzlösung (3M NaCl; 0,3M tri- Natriumcitrat, pH 7,0) statt. Das Gel wurde mit der Salzlösung überschichtet, durch das Vakuum wurde der Salzpuffer durch die poröse Platte in die Kammer gesaugt. Der hohe Salzgehalt der Lösung reißt die RNA mit sich, die dann an der Nylonmembran festgehalten wird.

Nach 90- 120 Minuten war die RNA vollständig auf die Nylonmembran geblotet.

Im Anschluss wurde die RNA für 20 Sekunden über UV- Licht mit einer Wellenlänge von 254nm auf dem Blot quervernetzt. Außerdem ließ sich die Qualität des Blots beurteilen, da native RNA bei 254nm sichtbar ist. Die S18- und S28- Banden wurden durch einschneiden der Nylonmembran markiert.

An dieses sogenannte Crosslinken schlossen wir eine fakultative Hitzefixierung der RNA an die Nylonmembran für 1 Stunde bei 80°C an.

2.8.2 Herstellung einer radioaktiv markierten Sonde

Zur Herstellung der Sonde wurden plasmidtragende Bakterien angezüchtet, die Plasmide isoliert, mit dem Restriktionsenzym Eco R-I geschnitten und das Produkt elektrophoretisch aufgetrennt.

Das elektrophoretisch aufgereinigte Fragment wurde aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des Gene- Clean- Kits (Fa. Dianova, Hamburg, Deutschland) wie folgt isoliert:

Das Gelfragment wurde in ein zuvor gewogenes 1,5ml Reaktionsgefäß (Fa. Sarstedt) überführt. Das Gelgewicht wurde ermittelt. Aus dem Kit wurden 0,5x Gelgewicht in [µl] des TBE- Modifier (im Kit enthalten) und 4,5x Gelgewicht in [µl] NaJ (im Kit enthalten) zugegeben. Das Gemisch wurde bei 50°C erwärmt, bis sich das Gel vollständig gelöst hatte. Die nun frei gewordene DNA wurde an Glasmilch (im Kit enthalten) gebunden. Pro 1µg DNA wurde 1µl Glasmilch zugegeben (jedoch mindestens 5µl). Das Gemisch wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dabei regelmäßig leicht von Hand gemixt. Nach Ablauf der Zeit wurde das Gemisch kurz zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde 3x mit je 400µl New- Wash- Waschlösung (im Kit enthalten) gewaschen. Der Überstand wurde jeweils verworfen.

Die Elution erfolgte mit 10µl sterilem Wasser. Das Pellet wurde vollständig resuspendiert, die Probe für 3 Minuten bei 50°C inkubiert, anzentrifugiert und der Überstand, der die DNA enthielt, vorsichtig abpipettiert und in ein 0,5ml Reaktionsgefäß überführt. Dieser

Elutionsschritt wurde zweimal wiederholt. Im Anschluss wurde das Eluat gepoolt, und ein 5µl- Aliquot auf einem 1,5%igen Agarose- TBE- Testgel auf Reinheit und Größe überprüft. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 80Volt über 35 Minuten.

Die restlichen 15µl Eluat wurden zur Herstellung der radioaktiv markierten DNA- Sonde verwendet.

Die radioaktive Markierung erfolgte mit dCT³²P (Fa. Hartmann).

Das isolierte Insert wurde mit DEPC- Wasser auf ein Volumen von 23µl aufgefüllt und für 3- 4 Minuten bei 100°C denaturiert, anschließend auf Eis abgekühlt.

Die Primingreaktion erfolgte nach der Random- Primer- Methode. Die Reaktion lief in einem Gesamtvolumen von 50µl ab. Als Reaktionspuffer wurden zunächst 15µl Random Primer Buffer- Mix (Gibco BRL) vorgelegt.

Die Nukleotide (Fa. Gibco BRL) wurden in folgender Reihenfolge pipettiert:

- dATP 2mM 2µl
- dGTP 2mM 2µl
- dTTP 2mM 2µl
- dCT³²P 5µl

Zu dem Reaktionsgemisch wurde 23µl denaturiertes Fragment gegeben. Die Reaktion wurde durch 5U (1µl) Klenow Fragment (Gibco BRL), ein Fragment der DNA- Polymerase I von E. coli, katalysiert.

Der Ansatz wurde für 60 Minuten bei 25°C inkubiert.

Anschließend wurde die so hergestellte Sonde über Nick Column- Säulen (Fa. Amersham Pharmacia Biotech) folgendermaßen aufgereinigt:

Die Säule wurde mit STE- Puffer (Tris/ EDTA pH 8,0) vorbereitet. Dann wurde die Sonde (50µl) über die Säule geschickt. Die Sonde wurde in der Membran festgehalten.

Die Elution erfolgte mit 400µl STE- Puffer.

1µl der Sonde wurden mit 4ml Hydroluma (Fa. Baker, Groß Gerau, Deutschland) gemischt, und am Gamma- Counter wurde die Aktivität gemessen.

Die gemessene Einbaurate sollte zwischen 50.000 bis 150.000 cpm liegen. Aus diesem Wert lässt sich die benötigte Menge der Sonde berechnen, indem die Konstante 12.500.000 durch die gemessene Anzahl der Counts (cpm) dividiert wird.

Im Durchschnitt reicht die Aktivität einer Sonde (400µl) für die Hybridisierung von 4 Blots.

2.8.3 Hybridisierung

Die Hybridisierung der Blots erfolgte mit einer radioaktiv markierten DNA- Sonde. Die Sondenherstellung ist unter Punkt 2.8.2 beschrieben.

Der Hybridisierungsmix (Fa. Clontech Laboratories GmbH, Heidelberg, Deutschland) wurde im Wasserbad bei 68°C vorgewärmt.

Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurde zunächst eine Vorhybridisierung mit 10 ml Hybridisierungslösung für 30 Minuten durchgeführt.

Die Sonde wurde 3 Minuten bei 95°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Für die eigentliche Hybridisierung wurde 1,5x10⁶ CPM/ml Hybridisierungslösung in die Hybridisierungsröhre pipettiert. Die Hybridisierung erfolgte für 60 Minuten im Hybridisierungsöfen bei 68°C.

Nach der Hybridisierung wurde die überschüssige Sonde in zwei Waschschrinen ausgewaschen.

- 3x SSC + 0,1% SDS (Sodium Dodecyl Sulfat; Fa. Sigma- Aldrich) für 20 Minuten bei Raumtemperatur
- 0,5x SSC + 0,1% SDS für 20 Minuten bei 50°C

Die Blots wurden für 72 Stunden bis zu 25 Tage bei -80° an einen Röntgenfilm (X-OMAT AR; Fa. Kodak) exponiert. Die Entwicklung der Röntgenfilme erfolgte maschinell.

Die Blots wurden mehrfach verwendet und mit unterschiedlichen Sonden untersucht. Um eine Sonde abzulösen, wurde der Blot für 10 Minuten mit einer 0,5% SDS- Lösung bei 100°C im Schüttel- Wasserbad behandelt. Die Blots wurden danach bei 80°C getrocknet oder direkt weiter verwendet. Sie lassen sich durch diese Prozedur bis zu fünf Mal hybridisieren.

2.9 Realtime- PCR (TaqMan®- PCR)

Die TaqMan®- PCR ist eine Methode, um Nukleinsäuresequenzen quantitativ nachzuweisen. Sie beruht auf dem Prinzip der PCR. Das PCR- Produkt kann jedoch im Gegensatz zur konventionellen PCR gleichzeitig mit der Reaktion quantitativ nachgewiesen werden. Hierfür

ist eine Sonde verantwortlich, die am 5'-Ende einen Reporterfarbstoff (Fluoreszeinderivat), und am 3'-Ende einen sog. Quencherfarbstoff (Rhodaminfarbstoff) gebunden hat. Die Sonde bindet zwischen den spezifischen TaqMan®-PCR-Primern an die amplifizierten DNA-Fragmente. Mit dem Enzym Ampli-Taq-Polymerase findet eine PCR-Reaktion statt. Die TaqMan®-PCR nutzt die 5'-Exonukleaseaktivität des Enzyms aus. Dabei wird, ausgehend von dem Forward-Primer, der komplementäre DNA-Strang synthetisiert. Trifft die Ampli-Taq-Polymerase dabei auf die Sonde, so wird diese aufgrund der Exonukleaseaktivität von der DNA abgelöst. Dabei wird zunächst der Reporterfarbstoff frei. Ist das PCR-Produkt vollständig synthetisiert, wird auch der Quencherfarbstoff frei. Sind der Reporterfarbstoff und der Quencherfarbstoff durch den enzymatischen Abbau voneinander getrennt, gibt der Reporterfarbstoff bei Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 488nm ein Fluoreszenzsignal. Anhand der Höhe dieses Signals kann die Menge an Ausgangs-DNA bestimmt werden. Wird hingegen die intakte Sonde angeregt, so unterdrückt der Quencherfarbstoff aufgrund seiner räumlichen Nähe zum Reporterfarbstoff dessen Fluoreszenz.

Da es, wie oben beschrieben, nur dann zu einer Hydrolyse der TaqMan®-Sonde durch die Ampli-Taq-DNA-Polymerase kommen kann, wenn Sonde und Template sequenzspezifisch hybridisiert haben, kann nur ein Signal nachgewiesen werden, falls es zu einer Amplifikation der Zielsequenz gekommen ist. Das bedeutet, dass unspezifische Nebenprodukte nicht detektiert werden.

Das Signal ist also strikt sequenzspezifisch, da nicht vollständig gebundene Sonden verdrängt werden, noch bevor die Exonucleaseaktivität der Polymerase aktiv wird.

2.9.1 Spezifische Primer für die TaqMan®-PCR

Um Primer für die TaqMan®-PCR zu entwerfen, müssen wie bei der konventionellen PCR bestimmte Kriterien erfüllt werden.

Sie wurden mit einem automatischen Programm zur Sondenauswahl entworfen („Primer Express“; Fa. Applied Biosystems GmbH Weiterstadt, Deutschland).

Die zugrunde liegenden Kriterien für die TaqMan®-PCR-Primer sind folgende:

- Primerlänge zwischen 18-30 Basen
- GC-Gehalt etwa 20-80%
- Es dürfen keine Poly-(I)-Bereiche vorkommen, da diese zu unspezifischen Bindungen führen würden.

- keine palindromischen Sequenzen
- keine 3'-Komplementarität, weil es zu Primer-Dimer-Bildung kommen kann
- Schmelztemperatur: 58-60°C
- Die optimale Länge des Amplicons liegt zwischen 75-150 Basenpaaren.
- Die Primer müssen HPLC aufgereinigt werden.

TaqMan®- PCR- Primer:

IGF-I 132F 5'- TTT CAA CAA GCC CAC AGG G- 3'

IGF-I 193R 5'- CCA CGA TGC CTG TCT GAG G- 3'

IGF-II 146F 5'- CTT CTA CTT CAG CAG GCC CG- 3'

IGF-II 213R 5'- AAC AGC ACT CCT CAA CGA TGC- 3'

IGF-IR 33F 5'- CTC TTC CCC AAC CTC ACG G- 3'

IGF-IR 99R 5'- CGA AGA TGA CCA GGG CGT AG- 3'

IGF-IIR 257F 5'- ACG GGA AGA AGC GCT ATG AC- 3'

IGF-IIR 318R 5'- CCA ATT ATG CTC TGG TTC TGC- 3'

Übliche Primerkonzentrationen in der TaqMan®- PCR liegen zwischen 0,2- 0,5µM.

2.9.2 TaqMan®- PCR- Sonde

Neben den spezifischen Primern für das zu detektierende PCR- Produkt muss eine Sonde mit gebundenen Farbstoffen entworfen werden, die das Farbsignal der Reaktion gibt. Es handelt sich um den, kovalent an das 5'- Ende gebundenen Reporter- Farbstoff FAM (6- Carboxy-Fluoreszein; Anregungswellenlänge: 488nm; Emissionswellenlänge:518nm) und den an das 3'- Ende gebundenen Quencher- Farbstoff TAMRA (6 Carboxy- tetramethyl-rhodamin; Anregungswellenlänge: 488nm; Emissionswellenlänge: 582nm). Das 3'- Ende der Sonde ist chemisch phosphoryliert, um eine Extension des 3'- Endes der Sonde, während der PCR, zu vermeiden.

Die Sonde muss so gewählt werden, dass sie, in dem von den Primern flankierten Teil der DNA, bindet. Es sollte der Strang für die Sondenbindung gewählt werden, der mehr C als G

innerhalb der Sondensequenz enthält. Außerdem sollte die Sonde so platziert werden, dass das 5'- Ende der Sonde möglichst nahe am 3'- Ende des PCR- Primers liegt.

Die Sondengröße sollte bei 20-30 Basenpaaren liegen, der GC- Gehalt sollte 40-60% betragen. Am 5'- Ende der Sonde darf sich kein G befinden, da dies seinerseits zu einer Unterdrückung des Reportersignals führen kann, sollte es zur Sondenhydrolyse kommen. Eine Komplementarität zwischen Sonde und Primern muss vermieden werden.

Die T_m der Sonde muss um 5-10°C höher liegen als die T_m der Primer, um die höhere Stabilität der Primer- Template Bindung zu kompensieren.

Taq- Man®- PCR - Sonden:

IGF-I 153T 5'- 6Fam- TGG CTC CAG CAG TCG GAG GGC- Tamra 3'

IGF-II 167T 5'- 6Fam- AAG CCG TGT GAG CCG TCG CAG- Tamra 3'

IGF-IR 53T 5'- 6Fam- CAT CCG CGG CTG GAA ACT CTT CTA CA- Tamra 3'

IGF-IIR 208T 5'- 6Fam- TCC GCG CTG GTC CGC CA- Tamra 3'

Die übliche Sondenkonzentration liegt im Bereich von 50-200nmol/ 50µl und ist abhängig von Fluoreszenzhintergrund und Primer- Konzentration.

2.9.3 Reaktionsbedingungen der TaqMan®- PCR

Die Reaktion lief in Mikrotiterplatten (Micro Amp optical 96 Well; Fa. Applied Biosystem) ab, die Farbemissionen wurden gemessen (ABI Prism 7700 Sequence Detector; Fa. Percin Elmer, Weiterstadt, Deutschland) und mit einem integrierten Computerprogramm ausgewertet.

Es wurde aus den Reagenzien des TaqMan®- Reaction- System (TaqMan® Universal Mastermix; Fa. Applied Biosystems) ein Mastermix hergestellt, der folgende Komponenten enthielt:

- 10x Reaktionspuffer 5,0µl
- MgCl₂ 25mM 7,0µl
- dNTP 2,5mM 4,0µl
- Forward Primer 10µM 1,5µl
- Reverse Primer 10µM 1,5µl
- Sonde 10µM 1,0µl
- Hot Gold Star Enzym 0,025U

- Template 208ng/ 10µl 10,0µl
- mit Aqua destillata auf 50,0µl Gesamtreaktionsvolumen auffüllen

Die Magnesium- Ionen- Konzentration spielt auch bei der TaqMan®- PCR eine wichtige Rolle für die Stabilisierung der Sonde. Sie verhindert eine Ablösung der Sonde von der DNA-Matrize. Außerdem spielt sie eine Rolle bei der Unterdrückung eines Farbsignals, wenn die Sonde nicht geschnitten wird. Dies geschieht auf folgende Weise: Mg²⁺- Ionen lagern sich an die intakte Sonde an und verhindern so eine gestreckte Sekundärstruktur des Moleküls, die es aufgrund seiner sich abstoßenden Ladungen annehmen würde. Hierdurch würden der Reporter- und der Quencherfarbstoff in räumliche Distanz geraten und eine Auslöschung des Reporter- Farbsignals wäre nicht sicher gewährleistet.

Die Zyklusbedingungen der TaqMan®- PCR weichen von denen der konventionellen PCR ab. Die Denaturierungstemperaturen sollten in den ersten Zyklen bei 94-96°C liegen, um eine Denaturierung der genomischen DNA zu gewährleisten. In den folgenden Zyklen sollte sie allerdings unter 94°C reduziert werden, da zum einen dann genug PCR- Produkt vorliegt, welches kürzer ist und bei geringeren Temperaturen zuverlässig denaturiert, zum anderen verkürzt eine hohe Denaturierungstemperatur die Aktivitätshalbwertszeit der Taq-Polymerase. Mit höheren Annealingtemperaturen können in der TaqMan®- PCR generell spezifischere Produkte generiert werden. Die optimale Annealingtemperatur wird empirisch ermittelt. Sie sollte unterhalb der Schmelztemperatur der Sonden liegen.

Die PCR- Bedingungen waren wie folgt:

- 50°C 2 Minuten
- 95°C 12 Minuten
- 40 Zyklen
- 95°C 15 Sekunden
- 60°C 1 Minute
- 25°C 2 Minuten

Die Vorschaltung eines zweiminütigen Zyklus bei 50°C ist deshalb notwendig, weil spezielle Zusätze zum Schutz von Carryover- Kontaminationen eingesetzt wurden. Die anschließenden 12 Minuten bei 95°C aktivieren das Enzym Ampli- Taq- Gold, welches in den Versuchen eingesetzt wurde. Das Enzym besitzt eine signifikante Aktivität bereits bei Temperaturen von

unter 55°C, so dass der Annealing- und Extensionsschritt in einem gemeinsamen Schritt zusammengefasst werden können.

Für diese Untersuchung wurde die cDNA eingesetzt, die im RT- Schritt, wie unter 2.5 beschrieben, gewonnen wurde. Zur Kontrolle, ob eine intakte cDNA synthetisiert wurde, wurde eine PCR mit hCo1, einem so genannten Housekeeping- Gen, durchgeführt.

2.9.4 Quantifizierungsstrategien

Die PCR- Methode lässt sich, unter Annahme einer 100%igen Effizienz der Reaktion, mit folgender Formel mathematisch beschreiben:

$$Y=X(1+E)^n$$

Wobei Y die Menge an Amplifikat, X die Startkopienzahl, E die Effizienz der Reaktion und n die Zyklenzahl darstellt.

In ihrer logarithmischen Darstellung lautet die Formel:

$$\log Y = \log X + n \log (1+E)$$

Diese Darstellung wird zur Erstellung einer Standardkurve benötigt.

Die Standardkurve ist die graphische Darstellung des Schwellenwertes (C_T) in Abhängigkeit vom Logarithmus der Startkopienzahl. Je geringer die Steigung des Graphen ist, desto höher ist die Effizienz der Reaktion. Die Effizienz ist von der Länge des Amplifikats abhängig. Je kürzer das Amplifikat ist, desto größer ist die Effizienz der PCR.

Es ergeben sich unterschiedliche Quantifizierungsstrategien. Zum einen gibt es die absolute Quantifizierung, bei der dem gemessenen Farbsignal eine bestimmte Menge an Startkopien zugeordnet wird.

Zum anderen gibt es die relative Quantifizierung. Hierbei wird die Expression der Zielsequenz relativ zu einer nicht verwandten Sequenz in Beziehung gesetzt. Diese Methode ist letztendlich eine semiquantitative Methode, bei der die unbekannte Menge der Zielsequenz relativ zum Signal der zweiten Sequenz (Standard), meist ein so genanntes Housekeeping- Gen wie Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH), abgeschätzt wird. Die Quantifizierung wird relativ zu einer Standardprobe als Kalibrator durchgeführt. Dadurch lässt sich die Zielsequenz als n-facher Wert des Kalibrators beschreiben. Von den Standards wird nur eine exakte Angabe der Verdünnung benötigt, nicht die genaue Anzahl der Startkopienzahl, da es sich um eine relative Darstellung handelt, bei der die Einheit entfällt.

Nach der Standardkurvenmethode können jetzt die Zielsequenz und die endogene Kontrolle getrennt amplifiziert werden, Standardkurven erstellt und so die Ausgangsmenge der Zielsequenz ermittelt werden.

Kann nachgewiesen werden, dass die Effizienz der Zielsequenz und die Effizienz des Standards identisch sind, was der Fall ist, wenn bei graphischer Darstellung die Steigung des Graphen der Effizienz unter 0,1 liegt, so darf die vergleichende C_T -Methode angewendet werden.

Sie lässt sich wie folgt mathematisch beschreiben:

2.9.5 Mathematische Beschreibung der zur Auswertung verwendeten vergleichenden C_T -Methode

Für eine Zielsequenz lässt sich die Formel bei Überschreiten des Schwellenwertes (C_T) wie folgt beschreiben:

$$X_T = X_0 (1+E_X)^{C_{TX}} = \text{konstant}$$

Hierbei ist X_T die Anzahl der hergestellten Zielsequenzmoleküle beim Schwellenwert (C_T -Wert),

X_0 bezeichnet die Startkopienzahl der Zielsequenzmoleküle,

E_X ist die Effizienz der Zielsequenz-Amplifikation, und

C_{TX} ist der Schwellenwert (Thresholdwert) für die Zielsequenz.

Für die endogene Referenz kann man eine entsprechende Formel aufstellen:

$$R_T = R_0 (1+E_R)^{C_{TR}} = \text{konstant}$$

Es gilt dieselbe Beschreibung wie für die Zielsequenz, wobei jetzt R für die Referenzsequenz steht.

Um vergleichbare Werte zu erhalten, wird die Anzahl der hergestellten Zielsequenzen durch die Anzahl der hergestellten Referenzmoleküle geteilt. Der Wert der Gleichung ist konstant.

$$X_T / R_T = X_0 (1+E_X)^{C_{TX}} / R_0 (1+E_R)^{C_{TR}} = \text{konstant}$$

Die Konstante des Bruchs muss nicht 1 betragen, da X_T und R_T von verschiedenen Faktoren abhängen. Größen, die Einfluss nehmen, sind:

- die Reporterfarbstoffe
- Sondensequenz und die Sondenlänge
- der Aufbau der Zielbereiche

- die Effizienz der Sondenhydrolyse
- das manuelle Festlegen des Schwellenwerts im Amplifikationsgraphen

Sind die Effizienzen beider Reaktionen gleich, ergibt sich die Gleichung mit normalisierten Werten:

$$X_0/R_0 (1+E)^{CT,X-CT,R} = \text{konstant}$$

Oder:

$$X_N (1+E)^{\Delta CT} = \text{konstant}$$

X_N entspricht dem normalisierten Wert X_0/R_0 der Zielsequenz;

ΔC_T entspricht dem Wert $C_{TX} - C_{TR}$, also dem Unterschied der Schwellenwerte für Zielsequenz und Referenz.

Nach Umstellung zur Berechnung des normalisierten Zielsequenzwertes lautet die Gleichung:

$$X_N = \text{konstant} (1+E)^{-\Delta CT}$$

Für jede Probe muss noch X_N durch den X_N - Wert des Kalibrators (kb) dividiert werden.

Daraus ergibt sich die folgende Gleichung:

$$X_{NX} / X_{Nkb} = (1+E)^{-\Delta \Delta CT}$$

In dieser Gleichung ist $\Delta \Delta C_T = \Delta C_{TX} - \Delta C_{Tkb}$

Bei Amplifikationsprodukten, die größer sind als 150bp, liegt die Effizienz nahe bei 100%. Die normalisierte Zielsequenz mit einer endogenen Referenz und relativ zu einem Kalibrator lässt sich daher näherungsweise berechnen mit:

$$X_{Nkb} = 2^{-\Delta \Delta CT}$$

Es muss gewährleistet sein, dass das Expressionsniveau des Standards konstant ist. Mit GAPDH (GAPDH Control Reagents; Fa. Applied Biosystems) wurde ein anerkannter Standard für viele Versuchsanordnungen eingesetzt, bei dem von einem konstanten Expressionsniveau auszugehen ist.

Diese Methode darf jedoch nur dann in dieser Form angewendet werden, wenn gezeigt wurde, dass die Effizienzen der Probe und des Standards identisch sind. Theoretisch werden unverwandte Sequenzen nämlich mit unterschiedlicher Effizienz amplifiziert.

Um die Effizienz zu überprüfen, wurden die ΔC_T - Werte der Zielsequenz und der Referenzsequenz bei verschiedenen Verdünnungsstufen der Matrizen verglichen und graphisch ausgewertet. Bei gleicher Effizienz der Probe und des Standards geht die Steigung des Graphen gegen Null.

In Vorversuchen konnte bewiesen werden, dass diese Bedingung erfüllt wird. Die absolute Steigung des Graphen lag in jedem Fall unter 0,1.

Aus diesem Grund konnte die $\Delta\Delta C_1$ -Methode ohne Standardkurven angewendet werden.

3 Ergebnisse

3.1 Zellkultur

Die Lungenfibroblasten wuchsen in unserem Labor unter den beschriebenen Bedingungen gut an. Sowohl in serumhaltigem Medium als auch in serumfreiem Medium waren die Zellen vital und zeigten keine wesentlichen Unterschiede im Wachstum. Bei niedriger Konfluenz zeigten die Fibroblasten ein Wachstumsmuster, das an die alveoläre Struktur der Lunge erinnert. Bei einem konfluenten, einschichtigen Zellrasen war diese Besonderheit kaum noch zu beobachten.

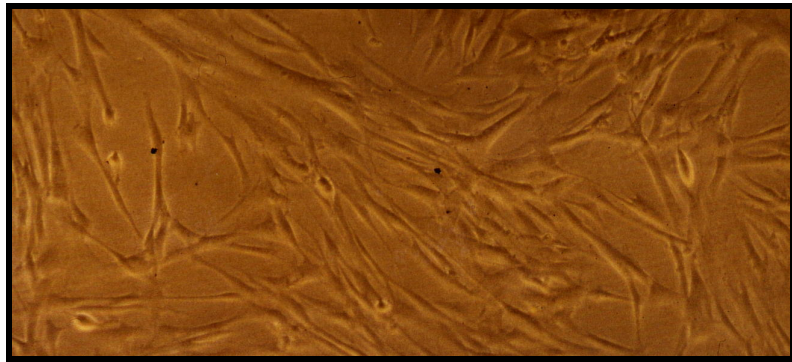


Abbildung 1: Humane fetale Lungenfibroblasten; 60% konfluent

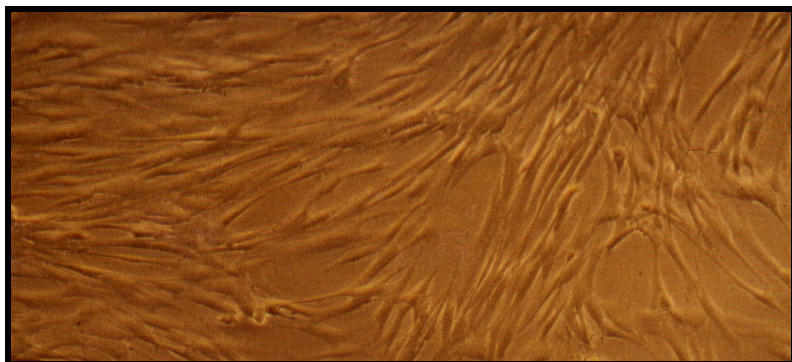
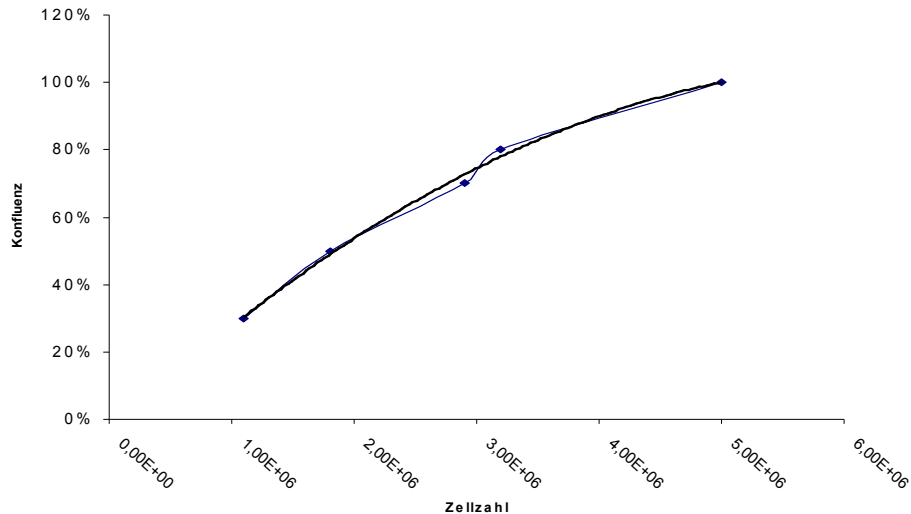


Abbildung 2: Humane fetale Lungenfibroblasten; 80%konfluent

Eine Darstellung des Wachstumsverhaltens und die Beziehung zwischen Konfluenz und Zellzahl zeigt die folgende Graphik:



Wachstumskurve humaner fetaler Lungenfibroblasten

Die Graphik zeigt das Verhältnis von Zellzahl zu Konfluenz in einer Zellkultur humaner fetaler Lungenfibroblasten. Es wurden bei verschiedenen optisch abgeschätzten Konfluenzen Zellzählungen vorgenommen, die Ergebnisse gemittelt und graphisch ausgewertet.

In der Zellkultur mit Cortisolzusatz fiel im Vergleich zum übrigen Zellwachstum eine höhere Zelldichte (etwa doppelt so schnelles Wachstum) bei Inkubation mit Cortisol 50nM und Cortisol 250nM auf. Dieser Unterschied war bei Cortisolkonzentrationen ab 500nM nicht mehr nachweisbar. Bei hohen Cortisolkonzentrationen (1mM) zeigte sich im Gegenteil ein wachstumshemmender Einfluss des Cortisols. Die Zellen waren irregulär geformt und zeigten vermehrt intrazelluläre Einschlüsse. Ähnliche Beobachtungen konnten weder bei DHT noch bei Estradiol gemacht werden. Hier zeigten sich keine Unterschiede im Wachstum abhängig von Hormonzusatz oder Konzentration. Die Zellen zeigten in der Hormoncharge und in der Negativkontrolle ein identisches Wachstumsverhalten und Aussehen.

3.2 RNA- Isolierung und Qualitätskontrolle

Auf den Formaldehydgelen zur Integritätsprüfung der RNA zeigten sich intakte ribosomale RNA- Banden, die zur Qualitätskontrolle der gesamt- RNA herangezogen wurden.

Folgende Kriterien gelten für eine intakte RNA:

- die 28S- Bande bei 4,9kb
- die 18S- Bande bei 1,8kb
- die 5S- Bande bei 0,5kb

Nicht degenerierte RNA zeigt deutlich voneinander getrennte Banden, wobei die 28S- Bande doppelt so stark ausgeprägt ist wie die 18S- Bande. Degenerierte RNA zeigt einen einzigen Film über das Gel ohne scharf abgetrennte Banden. Bei der für die Versuche verwendeten RNA waren alle drei Banden scharf voneinander getrennt zu finden.

Außerdem konnte regelmäßig eine zusätzliche Bande bei 10kb beobachtet werden.

Als Marker (M) diente eine 0,24- 9,5kb RNA- Ladder. (Fa. Gibco BRL)

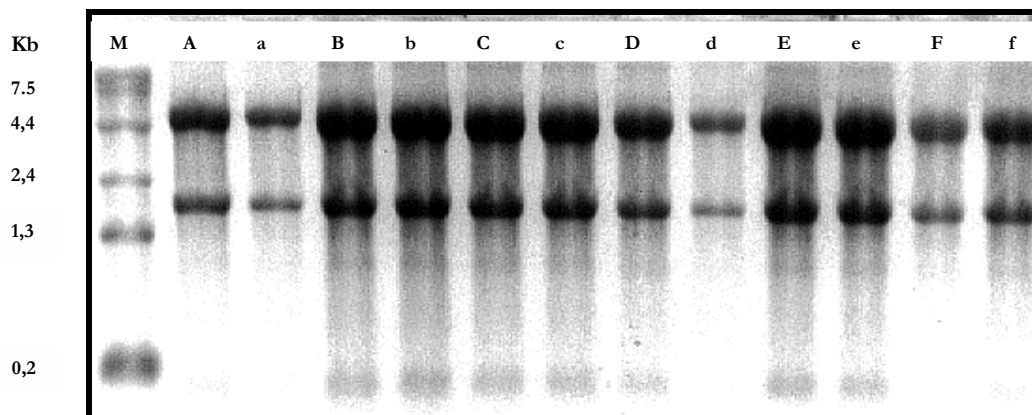


Abbildung 3: RNA- Integritätsanalyse- Gel (invertierte Darstellung)

Die Abbildung zeigt ein Integritätsgel zur Überprüfung der RNA- Qualität. Es sind jeweils Proben mit und ohne Hormon nebeneinander aufgetragen. Der Kleinbuchstabe markiert die entsprechende Negativprobe. Wie der Marker (M) zeigt, liegen die rRNA- Banden auf den zu erwartenden Positionen, die Gesamt- RNA ist intakt.

Bahn A: Cortisol 750nM 48h; Bahn B: Cortisol 750nM 24h; Bahn C: Cortisol 500nM 48h;
Bahn D: Cortisol 250nM 48h; Bahn E: Cortisol 50nM 48h; Bahn F: Cortisol 1000nM 24h;

Eine weitere qualitative Analyse sowie eine quantitative Analyse der RNA erfolgte durch die photometrische Messung gegen Wasser bei einer Wellenlänge von 260nm und 280nm.

Es zeigten sich dabei folgende Ergebnisse:

Die Werte für die Ratio der Absorptionen 260nm/280nm lagen im Durchschnitt bei 1,6 - 1,7.

Dies entspricht einer ausreichenden Reinheit der isolierten RNA bei einer Messung in Wasser.

Die quantitative RNA- Ausbeute lag im Durchschnitt zwischen 2 und 5 µg/µl. Dies ist eine Ausbeute, die den in der Literatur beschriebenen Werten für im Northernblot eingesetzte gesamt- RNA entspricht.

Eine detaillierte Aufstellung hierzu ist den folgenden Tabellen zu entnehmen.

Tabelle 1: RNA- Analyse – Absorptionsratio und Ausbeute bei DHT- Zusatz

	Absorption 260nm	Ratio Absorption 260nm/ 280nm	RNA- Konzentration [µg/µl]
DHT 0,1nM/ 2h	1,64	1,61	5,25
DHT 0,1nM/ 4h	1,54	1,65	4,94
DHT 0,1nM/ 12h	1,06	1,57	3,41
DHT 0,1nM/ 24h	1,02	1,71	3,25
DHT 0,1nM/ 48h	1,62	1,64	5,18
DHT 0,1nM/ 72h	1,14	1,67	3,63
DHT 0,5nM/ 2h	1,13	1,83	1,75
DHT 0,5nM/ 4h	0,77	1,80	1,19
DHT 0,5nM/ 12h	0,39	1,77	0,61
DHT 0,5nM/ 24h	0,30	1,86	0,46
DHT 0,5nM/ 48h	0,57	1,93	0,87
DHT 0,5nM/ 72h	0,50	1,76	0,75
DHT 1nM/ 2h	2,44	1,74	2,66
DHT 1nM/ 4h	2,27	1,72	2,33
DHT 1nM/ 12h	1,38	1,66	4,41
DHT 1nM/24h	1,73	1,62	5,55
DHT 1nM/ 48h	1,26	1,64	4,05
DHT 1nM/ 72h	1,29	1,68	4,13
DHT 5nM/ 2h	1,37	1,75	4,41
DHT 5nM/ 4h	1,29	1,77	4,13
DHT 5nM/ 12h	0,90	1,80	2,82
DHT 5nM/ 24h	0,89	1,77	1,38
DHT 5nM/ 48h	1,08	1,72	1,70
DHT 5nM/ 72h	1,16	1,70	1,85
DHT 10nM/ 2h	1,40	1,77	4,50
DHT 10nM/ 4h	1,78	1,75	5,72
DHT 10nM/ 12h	1,13	1,80	3,62
DHT 10nM/ 24h	0,74	1,66	2,35
DHT 10nM/ 48h	0,92	1,72	2,95
DHT 10nM/ 72h	1,25	1,70	4,00

Tabelle 2: RNA- Analyse – Absorptionsratio und Ausbeute bei Cortisolzusatz

	Absorption 260nm	Ratio Absorption 260nm/ 280nm	RNA- Konzentration [µg/µl]
Cortisol 50nM/ 2h	1,27	1,65	4,08
Cortisol 50nM/ 4h	0,70	1,67	2,20
Cortisol 50nM/ 12h	2,31	1,67	3,83
Cortisol 50nM/ 24h	1,97	1,68	2,93
Cortisol 50nM/ 48h	1,03	1,66	3,30
Cortisol 50nM/ 72h	2,05	1,67	3,50
Cortisol 250nM/ 2h	1,11	1,70	2,23
Cortisol 250nM/ 4h	1,05	1,72	2,10
Cortisol 250nM/ 12h	1,32	1,80	2,64
Cortisol 250nM/ 24h	0,15	1,90	0,23
Cortisol 250nM/ 48h	1,33	1,65	2,66
Cortisol 250nM/ 72h	1,70	1,60	2,70
Cortisol 500nM/ 2h	1,45	1,67	4,65
Cortisol 500nM/ 4h	1,93	1,69	3,81
Cortisol 500nM/ 12h	1,19	1,67	3,81
Cortisol 500nM/ 24h	1,00	1,67	3,18
Cortisol 500nM/ 48h	1,15	1,66	3,70
Cortisol 500nM/ 72h	0,84	1,62	2,70
Cortisol 750nM/ 2h	1,30	1,78	2,03
Cortisol 750nM/ 4h	1,43	1,78	2,23
Cortisol 750nM/ 12h	1,00	1,81	1,55
Cortisol 750nM/ 24h	0,11	1,60	3,55
Cortisol 750nM/ 48h	1,24	1,60	3,98
Cortisol 750nM/ 72h	1,60	1,65	2,50
Cortisol 1mM/ 2h	0,71	1,59	2,27
Cortisol 1mM/ 4h	2,12	1,64	2,29
Cortisol 1mM/ 12h	0,94	1,57	2,99
Cortisol 1mM/ 24h	0,81	1,57	2,58
Cortisol 1mM/ 48h	1,70	1,64	5,44
Cortisol 1mM/ 72h	0,95	1,58	3,05

Tabelle 3: RNA- Analyse – Absorptionsratio und Ausbeute bei Estradiolzusatz

	Absorption 260nm	Ratio Absorption 260nm/ 280nm	RNA- Konzentration [µg/µl]
E ₂ 0,01nM/ 2h	1,90	1,65	1,91
E ₂ 0,01nM/ 4h	1,60	1,62	1,68
E ₂ 0,01nM/ 12h	1,15	1,61	3,70
E ₂ 0,01nM/ 24h	1,33	1,67	4,26
E ₂ 0,01nM/ 48h	0,70	1,56	2,23
E ₂ 0,01nM/ 72h	1,23	1,63	3,92
E ₂ 0,1nM/ 2h	2,60	1,70	4,60
E ₂ 0,1nM/ 4h	3,00	1,60	4,75
E ₂ 0,1nM/ 12h	1,90	1,75	2,98
E ₂ 0,1nM/ 24h	0,85	1,69	1,36
E ₂ 0,1nM/ 48h	1,02	1,70	1,62
E ₂ 0,1nM/ 72h	2,10	1,75	3,30
E ₂ 10nM/ 2h	1,88	1,70	6,00
E ₂ 10nM/ 4h	2,50	1,70	1,42
E ₂ 10nM/ 12h	0,93	1,68	2,99
E ₂ 10nM/ 24h	0,77	1,64	2,45
E ₂ 10nM/ 48h	0,96	1,70	3,07
E ₂ 10nM/ 72h	0,95	1,67	3,05
E ₂ 1µM/ 2h	2,80	1,60	5,60
E ₂ 1µM/ 4h	0,60	1,66	1,20
E ₂ 1µM/ 12h	0,60	1,68	1,21
E ₂ 1µM/ 24h	0,93	1,65	1,49
E ₂ 1µM/ 48h	0,75	1,67	1,20
E ₂ 1µM/ 72h	0,77	1,65	1,23
E ₂ 10µM/ 2h	1,23	1,60	3,94
E ₂ 10µM/ 4h	1,44	1,60	4,62
E ₂ 10µM/ 12h	1,25	1,60	4,01
E ₂ 10µM/ 24h	1,00	1,63	3,22
E ₂ 10µM/ 48h	0,52	1,65	1,65
E ₂ 10µM/ 72h	0,86	1,59	2,77

3.3 RT- PCR

Dieser Untersuchungsschritt wurde durchgeführt, um zu beweisen, dass die Gene des IGF-Wachstumsfaktorsystems in den von uns untersuchten fetalen Lungenfibroblasten exprimiert werden. Es handelt sich um einen qualitativen Nachweis.

Um den Beweis zu führen, wurden exemplarisch Proben jeweils einer mittleren Konzentration der Steroidhormone ausgewählt, die für 24 Stunden inkubiert wurden. Ebenso wurden die entsprechenden Probenansätze ohne Hormonzugabe untersucht. Für alle untersuchten Wachstumsfaktorgene des IGF- Systems konnte eine Expression in humanen fetalen Lungenfibroblasten in Kultur nachgewiesen werden. Dies konnte sowohl für Proben mit Hormonzusatz als auch für die ohne Hormon inkubierten Negativkontrollen gezeigt werden. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 4a – e in invertierter Darstellung gezeigt. Als Marker wurde eine 100bp DNA- Ladder 2072 bis 100bp (Fa. Gibco BRL) verwendet.

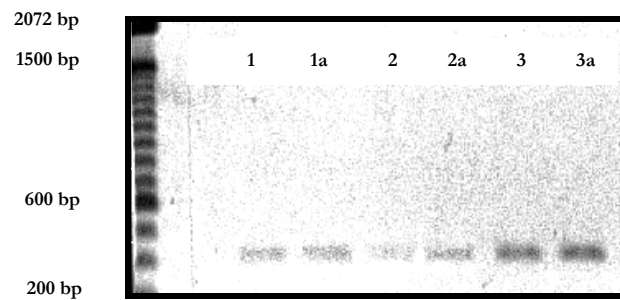


Abbildung 4a: IGF-I

Die Abbildungen 4a bis e zeigen die Ergebnisse der gelelektrophoretischen Auftrennung einer mit spezifischen Primern für IGF-I (Abb. 4a), IGF-II (Abb. 4b), IGF-I Rezeptor (Abb. 4c), IGF-II Rezeptor (Abb. 4d), IGF-BP-2 und IGF-BP-3 (Abb. 4e) durchgeführten RT- PCR. Untersucht wurden die Expressionen der Gene in einer aus humanen fetalen Lungenfibroblasten isolierten RNA.

Der Größenmarker ist jeweils ganz links dargestellt. Mit Kleinbuchstaben ist die entsprechende Negativprobe markiert.

Bahn 1: DHT 1nM 24h; Bahn 2: Cortisol 500nM 24h; Bahn 3: Estradiol 10nM 24h

Die in Abb. 4e dargestellte Bande auf Bahn 4 zeigt eine interne Methodenkontrolle mit humanen Vorhautfibroblasten, von denen eine Expression der zu untersuchenden Gene bekannt ist. In den übrigen Abbildungen ist diese nicht mit dargestellt.

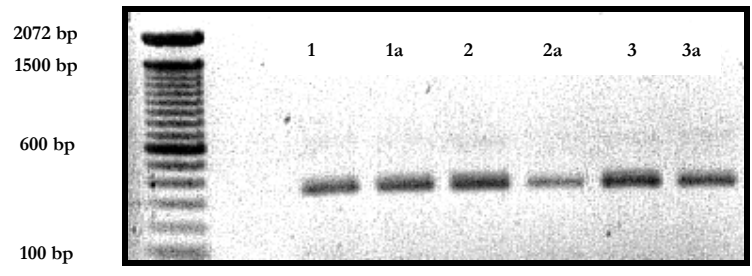


Abbildung 4b: IGF-II

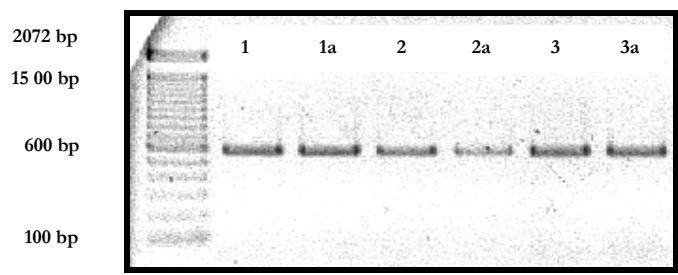


Abbildung 4c: IGF-I Rezeptor

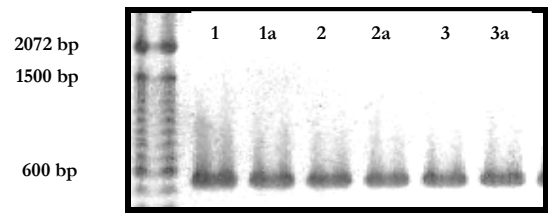


Abbildung 4d: IGF-II Rezeptor

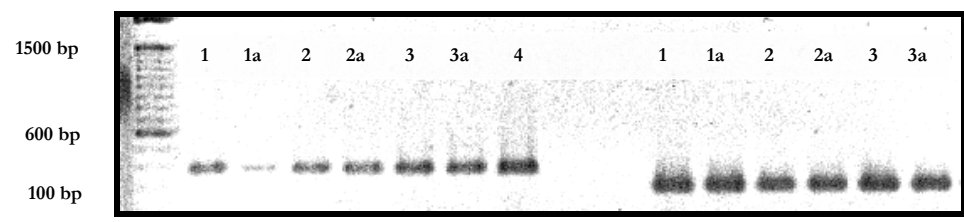


Abbildung 4e: IGFBP-2 (rechts) und IGFBP-3 (links)

3.4 Klonierung der PCR- Produkte

Die PCR- Produkte ließen sich gut in die kompetenten E. coli- Zellen inklonieren. Auf den Agar- Platten wuchsen sowohl Bakterienkolonien mit blauer als auch mit weißer Farbe.

Die blauen Kolonien waren aus Bakterienklonen hervorgegangen, die ein selbstligiertes Plasmid aufgenommen hatten. Bakterienklone, in die das Insert erfolgreich inkloniert werden konnte, zeigten aufgrund der Unterbrechung des lac- Z- Gens auf den X- Gal- haltigen Nährböden eine weiße Färbung.

Zur Kontrolle wurden die Plasmide isoliert und zum Sequenzieren an die Firma MWG-Biotech verschickt. Die Sequenzierungen ergaben für alle inklonierten Inserts die korrekten Sequenzen.

Ebenso zeigten elektrophoretische Untersuchungen der aus den Zellen isolierten und mit dem Restriktionsenzym EcoR-1 geschnittenen Plasmide eine Bande auf Höhe der entsprechend zu erwartenden Molekülgröße der ausgeschnittenen Inserts.

In der Abbildung 5 (invertierte Darstellung) ist beispielhaft das Ergebnis der Restriktion für IGF-I, IGF-II, IGF-I Rezeptor und IGF-II Rezeptor gezeigt. Es ist als Bande mit hohem Molekulargewicht der Plasmidrest zu erkennen, darunter sieht man auf definierter Höhe die spezifischen Banden der erfolgreich klonierten und geschnittenen Inserts.

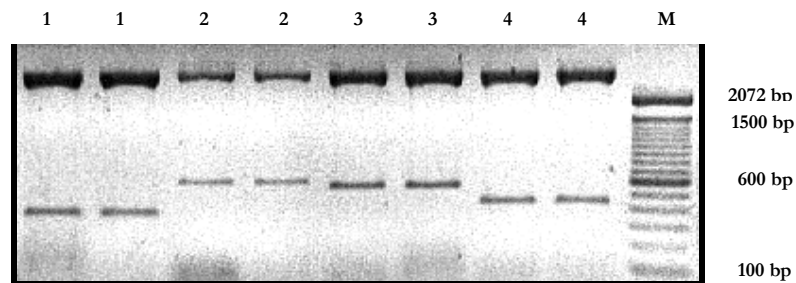


Abbildung 5: Restriktionsansatz der klonierten Gene

Die Abbildung zeigt das Ergebnis der gelelektrophoretischen Auftrennung der Restriktionsansätze. Es wurden die aus den E. coli isolierten Plasmide mit dem Enzym EcoR-1 verdaut. Eine Schnittstelle für EcoR-1 befindet sich im Plasmid jeweils vor und hinter dem inklonierten Insert. Mit hohem Molekulargewicht ist der Plasmidrest erkennbar, auf definierter Höhe finden sich die spezifischen Banden für IGF-I, IGF-II, IGF-I Rezeptor und IGF-II Rezeptor.

Bahn 1: Restriktionsergebnis IGF-II; Bahn 2: Restriktionsergebnis IGF-I Rezeptor

Bahn 3: Restriktionsergebnis IGF-II Rezeptor; Bahn 4: Restriktionsergebnis IGF-I;

M: Marker DNA- Ladder 2072bp bis 100bp

3.5 Northernblot

Nach dem qualitativen Nachweis durch die RT- PCR folgte die quantitative Untersuchung mittels Northernblot.

Dieser Versuchsschritt sollte die weiterführende Frage klären, ob durch die zugesetzten Steroidhormone eine Regulation der Expressionshöhe der Gene des IGF-Wachstumsfaktorsystems stattfindet.

Zunächst wurden nur die Blots mit der höchsten, der mittleren und der niedrigsten Konzentration der jeweiligen Hormone über alle Zeiten untersucht. Als spezifische Sonden dienten cDNA- Sonden von IGF-I, IGF-II, IGF-I Rezeptor, IGF-II Rezeptor und IGF-BP-2.

Die folgende Tabelle stellt die spezifischen Banden zusammen, wie sie in der Literatur bisher für die untersuchten RNAs des IGF- Systems beschrieben sind.

Tabelle 4: Übersicht über mRNA- Größen im Northernblot

IGF-I	1,1kb Hauptbande; Vorkommen in Plazenta	Höppener et al. 1988 Rotwein 1986
	1,4kb/ 1,7kb nur adulte Leber; wahrscheinlich reife RNA	Nagaoka et al. 1990
	3,7kb/ 3,8kb in Tumorgewebe vorhanden	
	6,3kb	
	7,6kb nur in adulter Leber; nicht in fetalem Gewebe	
	4,4kb Hauptbande in fetaler Rattenlunge 7,8kb 2,1kb 0,6kb	Wallen et Han 1997
IGF-II	6,0kb fetale Gewebe	Höppener et al. 1988
	4,8kb fetale Gewebe	de Pagter- Holthuisen et al. 1988
	2,2kb/ 2,1kb fetale Gewebe	1988
	1,8kb	de Pagter- Holthuisen et al. 1988
	4,0kb fetale Rattenlunge	Batchelor et al. 1995
	3,8kb Ratte fetales ges. Lungengewebe 2,2kb 1,8kb 1,0kb	Wallen et Han 1994
IGF-II R	9,0- 9,5kb fetale Lunge; Maus	Melnick et al. 1996
IGF-BP-2	1,4kb humanes Ovarialgewebe	El- Roeiy et al. 1994
	1,7kb fetale Rattenlunge	Batchelor et al. 1995
	1,8kb fetale Rattenlunge	Wallen et al. 1997

3.5.1 Qualitative und quantitative Analyse der Northernblots

Die Blots zeigten gleichmäßig scharfe Banden mit einer guten Auftrennung der unterschiedlich großen Transkripte.

Als Sonden wurden spezifische radioaktiv markierte cDNA- Sonden für IGF-I, IGF-II, IGF-I Rezeptor, IGF-II Rezeptor und IGF-BP-2 verwendet. Zur Quantifizierung erfolgte die Untersuchung mit einer 18S- RNA- spezifischen Sonde.

Die 18S- RNA ist eine ribosomale RNA und unterliegt damit keiner Regulation durch Steroidhormone.

3.5.1.1 IGF-I

Die Blots zeigten eine gleichmäßige Beladung mit RNA sowie eine gleichmäßige Auftrennung der RNA im Gel. Nach Hybridisierung mit der S 18- Sonde erkannte man spezifische Banden von annähernd identischer Intensität. Dies ließ auf eine insgesamt gute Qualität der Blots und das Funktionieren der Methode schließen. Nach Exposition der Blots an die IGF-I- Sonde waren keine spezifischen Banden auf einer der bisher in der Literatur (siehe Tabelle 4) beschriebenen Höhen im Gel zu erkennen. Die Gele wurden mit Ethidiumbromid gefärbt. Die native RNA wurde so visualisiert und die Banden des Markers wurden markiert. Auf diese Weise hätte die Höhe spezifischer Banden abgemessen werden können.

Die Expositionsdauer betrug 480 Stunden.

Es ist exemplarisch das Ergebnis für Cortisol 50nM nach Exposition an die IGF-I- Sonde und nach Exposition an die 18S- Sonde in invertierter Darstellung abgebildet (Abb. 6a und b). Die übrigen Northernblots zeigten ein entsprechendes Ergebnis.

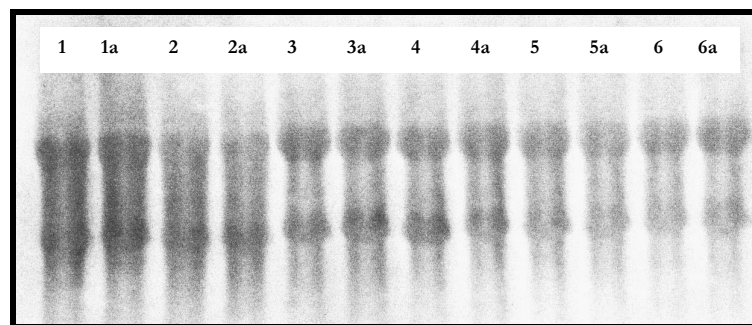


Abbildung 6a: Northernblot Cortisol 50nM; IGF-I- Sonde

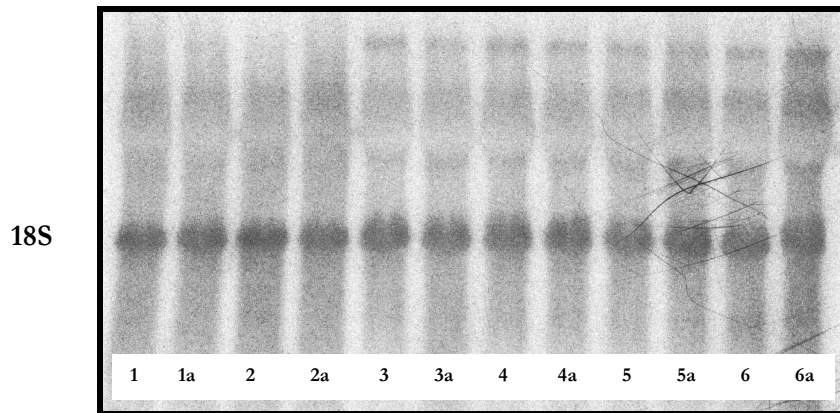


Abbildung 6b: Northernblot Cortisol 50nM; 18S- Sonde

Die Abb. 6a zeigt einen Northernblot von RNA aus humanen fetalen Lungenfibroblasten, die mit 50nM Cortisol über unterschiedliche Zeiträume inkubiert wurden. Der Blot wurde an eine spezifische IGF-I- DNA- Sonde exponiert.

Die Abb. 6b zeigt den gleichen Blot exponiert an eine 18S- Sonde.

Als Marker wurde ein RNA- Marker verwendet, der hier nicht zur Darstellung kommt.

Mit dem Zusatz (a) ist die Negativprobe ohne Hormon bezeichnet.

Bahn 1: 2 Stunden; Bahn 2: 4 Stunden; Bahn 3: 12 Stunden; Bahn 4: 24 Stunden;

Bahn 5: 48 Stunden; Bahn 6: 72 Stunden Inkubationszeit mit Cortisol 50nM

3.5.1.2 IGF-II

Bei der Auswertung dieser Blots wurde entsprechend wie bei der IGF-I- Sonde verfahren. Als Kontroll- Sonde diente auch hier eine 18S- Sonde.

Die Expositionszeit war ebenfalls 480 Stunden, ohne dass durch die Verlängerung der Exposition spezifische Banden auf der entsprechenden Höhe (Tabelle 4) nachgewiesen werden konnten.

Es sind exemplarisch die Northernblots für DHT 10nM in invertierter Darstellung dargestellt (Abb. 7a und b), bei den übrigen Blots zeigte sich ein vergleichbares Ergebnis.

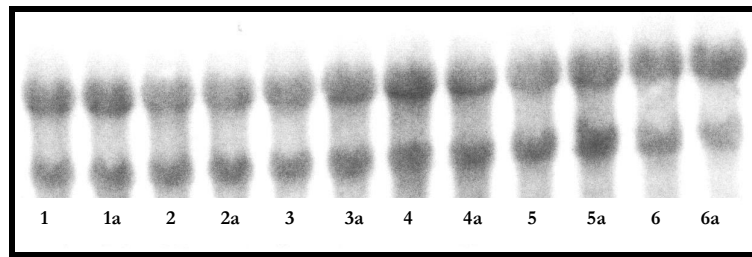


Abbildung 7a: Northernblot DHT 10nM; IGF-II- Sonde

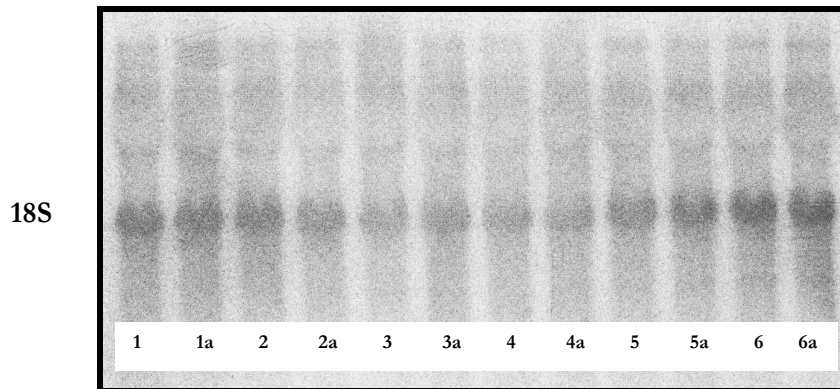


Abbildung 7b: Northernblot DHT 10nM; 18S- Sonde

Die Abb. 7a zeigt einen Northernblot von RNA aus humanen fetalen Lungenfibroblasten, die mit 10nM DHT über unterschiedliche Zeiträume inkubiert wurden. Der Blot wurde an eine spezifische IGF-II- DNA- Sonde exponiert.

Die Abb. 7b zeigt den gleichen Blot exponiert an eine 18S- Sonde.

Als Marker wurde ein RNA- Marker verwendet, der hier nicht zur Darstellung kommt.

Mit dem Zusatz (a) ist die Negativprobe ohne Hormon bezeichnet.

Bahn 1: 2 Stunden; Bahn 2: 4 Stunden; Bahn 3: 12 Stunden; Bahn 4: 24 Stunden;

Bahn 5: 48 Stunden; Bahn 6: 72 Stunden Inkubationszeit mit DHT 10nM

3.5.1.3 IGF-I Rezeptor

Bei entsprechender Versuchsdurchführung und identischer Inkubationszeit wie für die übrigen Blots beschrieben, ließen sich auch für den IGF-I Rezeptor keine spezifischen Banden nachweisen (Keine Northernblots abgebildet).

3.5.1.4 IGF-II Rezeptor

Bei der Versuchsdurchführung wurde wie zuvor beschrieben vorgegangen. Bei der Exposition an die 18S- Sonde zeigte sich auch hier eine gute Qualität der Blots. Die Expositionszeit an die IGF-II Rezeptor- Sonde wurde auf 480 Stunden ausgedehnt, ohne dass spezifische Banden nachgewiesen werden konnten. Abgebildet ist ebenfalls ein exemplarischer Blot für Estradiol 10 μ M in invertierter Darstellung mit entsprechendem Kontroll- Northernblot.

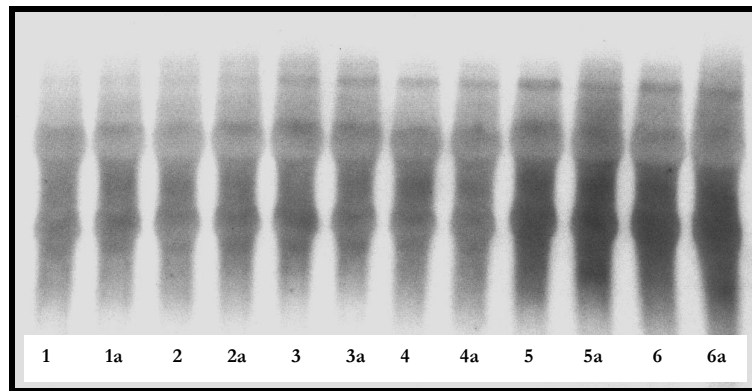


Abbildung 8a: Northernblot 10 μ M Estradiol; IGF-II Rezeptor

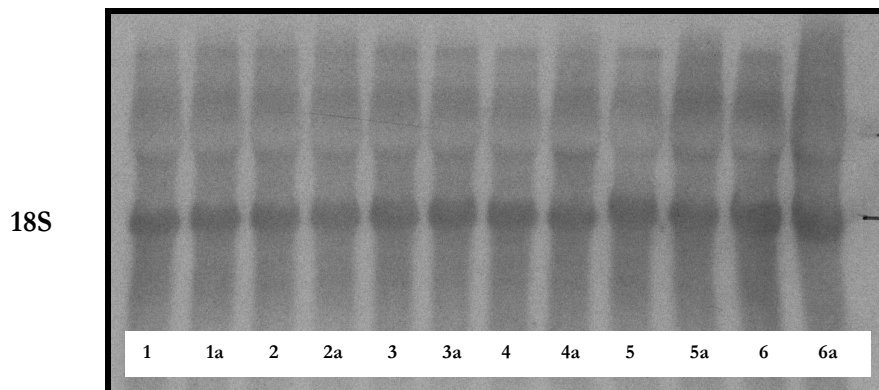


Abbildung 8b: Northernblot 10 μ M Estradiol; 18S- Sonde

Die Abb. 8a zeigt einen Northernblot von RNA aus humanen fetalen Lungenfibroblasten, die mit 10 μ M Estradiol über unterschiedliche Zeiträume inkubiert wurden. Der Blot wurde an eine spezifische IGF-II Rezeptor- DNA- Sonde exponiert.

Die Abb. 8b zeigt den gleichen Blot exponiert an eine 18S- Sonde.

Als Marker wurde ein RNA- Marker verwendet, der hier nicht zur Darstellung kommt.

Mit dem Zusatz (a) ist die Negativprobe ohne Hormon bezeichnet.

Bahn 1: 2 Stunden; Bahn 2: 4 Stunden; Bahn 3: 12 Stunden; Bahn 4: 24 Stunden;

Bahn 5: 48 Stunden; Bahn 6: 72 Stunden Inkubationszeit mit Estradiol 10 μ M

3.5.1.5 IGF-BP-2

Bei entsprechender Versuchsdurchführung wie für die übrigen Blots beschrieben ließen sich auch für IGF-BP-2 keine spezifischen Banden nachweisen (Keine Northernblots abgebildet).

3.6 Taq-Man®- PCR

Es fanden sich relative Expressionshöhen, bezogen auf die basale Expression des IGF-I-Gens ohne Hormonzusatz, zwischen 0,13 bei 2 Stunden Inkubationszeit und 1,34 bei 72 Stunden Inkubationszeit für DHT 1nM; zwischen 0,15 und 0,75 für Cortisol 500nM und zwischen 0,17 und 2,80 für Estradiol 10nM.

Die relativen Expressionshöhen des IGF-I Rezeptor- Gens bezogen auf die basale Expression ohne Hormon lagen zwischen 0,52 und 1,07 für DHT, zwischen 0,33 und 0,98 für Cortisol 500nM und zwischen 0,31 und 1,64 für Estradiol 10nM.

Beim IGF-II- Gen lagen die relativen Expressionshöhen bezogen auf die Expression ohne Hormon zwischen 0,22 und 1,46 für DHT 1nM, zwischen 0,38 und 1,40 für Cortisol 500nM und zwischen 0,48 und 1,09 für Estradiol 10nM.

Bezogen auf die Expression ohne Hormon lagen die relativen Expressionshöhen des IGF-II-Rezeptor- Gens zwischen 1,12 und 2,84 für DHT 1nM, zwischen 0,39 und 1,22 für Cortisol 500nM und zwischen 0,70 und 1,25 für Estradiol 10nM.

Einen Überblick über die Messmittelwerte geben die folgenden Tabellen.

Tabelle 5: TaqMan®- PCR Ergebnisse für IGF-I

Bedingung	C_T IGF-I	C_T GAPDH	Δ - C_T	$\Delta\Delta$ - C_T	$2^{\Delta\Delta-CT}$
2h Ø Hormon	32,74	18,125	14,615	0	1
2h DHT 1nM	35,82	18,213	17,607	2,992	0,126
Cortisol 500nM	33,325	18,287	15,038	0,423	0,746
Estradiol 10nM	35,065	17,881	17,184	2,569	0,169
4h Ø Hormon	32,565	18,308	14,257	0	1

4h DHT 1nM	34,575	18,079	16,496	2,239	0,212
Cortisol 500nM	34,86	17,883	16,977	2,72	0,152
Estradiol 10nM	33,545	18,136	15,409	1,152	0,45
12h Ø Hormon	33,585	18,039	15,546	0	1
12h DHT 1nM	34,58	18,043	16,537	0,991	0,503
Cortisol 500nM	34,345	18,221	16,134	0,588	0,665
Estradiol 10nM	33,285	19,225	14,06	-1,486	2,801
24h Ø Hormon	35,235	18,335	16,9	0	1
24h DHT 1nM	37,17	17,937	19,233	2,333	0,198
Cortisol 500nM	36,9	18,23	18,67	1,77	0,293
Estradiol 10nM	35,5	19,003	16,497	-0,403	1,322
48h Ø Hormon	35,115	17,945	17,17	0	1
48h DHT 1nM	38,03	19,079	18,951	1,781	0,291
Cortisol 500nM	36,705	18,095	18,61	1,44	0,639
Estradiol 10nM	35,92	18,236	17,684	0,514	0,700
72hØ Hormon	36,255	18,347	17,908	0	1
72h DHT 1nM	35,26	17,777	17,483	-0,425	1,343
Cortisol 500nM	36,44	17,775	18,665	0,757	0,592
Estradiol 10nM	36,77	19,216	17,554	-0,354	1,278

Tabelle 6: TaqMan®- PCR Ergebnisse für IGF-I- Rezeptor

Bedingung	C _T IGF-I- Rezeptor	C _T GAPDH	Δ- C _T	ΔΔ-C _T	2 ^{ΔΔ-CT}
2h Ø Hormon	28,645	19,466	9,179	0	1
2h DHT 1nM	29,155	19,336	9,819	0,64	0,642
Cortisol 500nM	28,68	19,253	9,427	0,248	0,842
Estradiol 10nM	29,52	19,529	9,991	0,812	0,569
4h Ø Hormon	29,02	19,328	9,692	0	1
4h DHT 1nM	29,085	19,162	9,923	0,231	0,852
Cortisol 500nM	29,06	19,345	9,715	0,023	0,984

Estradiol 10nM	28,505	19,526	8,979	-0,713	1,639
12h Ø Hormon	28,73	19,649	9,081	0	1
12h DHT 1nM	28,73	19,342	9,823	0,742	0,598
Cortisol 500nM	29,79	19,61	10,18	1,099	0,467
Estradiol 10nM	31,13	20,341	10,789	1,708	0,306
24h Ø Hormon	29,365	19,849	9,516	0	1
24h DHT 1nM	28,91	19,095	9,815	0,299	0,813
Cortisol 500nM	30,74	19,61	11,13	1,614	0,327
Estradiol 10nM	30,92	20,34	10,58	1,064	0,478
48h Ø Hormon	29,275	19,35	9,925	0	1
48h DHT 1nM	29,905	20,084	9,821	-0,104	1,075
Cortisol 500nM	30,115	19,473	10,642	0,717	0,608
Estradiol 10nM	29,725	19,756	9,969	0,044	0,970
72hØ Hormon	28,815	19,618	9,197	0	1
72h DHT 1nM	29,305	19,152	10,153	0,956	0,515
Cortisol 500nM	28,815	19,047	9,764	0,571	0,673
Estradiol 10nM	31,445	20,797	10,648	1,451	0,366

Tabelle 7: TaqMan®- PCR Ergebnisse für IGF-II

Bedingung	C _T IGF-II	C _T GAPDH	Δ- C _T	ΔΔ-C _T	2 ^{ΔΔ-CT}
2h Ø Hormon	22,655	18,596	4,059	0	1
2h DHT 1nM	22,885	18,267	4,293	0,234	0,850
Cortisol 500nM	23,245	17,781	5,464	1,405	0,378
Estradiol 10nM	23,465	18,356	5,109	1,05	0,483
4h Ø Hormon	23,09	18,252	4,838	0	1
4h DHT 1nM	22,75	18,457	4,293	-0,545	1,459
Cortisol 500nM	24,85	18,923	5,927	1,09	0,470
Estradiol 10nM	23,17	18,349	4,821	-0,017	1,011
12h Ø Hormon	22,44	18,737	3,703	0	1
12h DHT 1nM	22,32	18,122	4,198	0,495	0,709

Cortisol 500nM	22,945	18,676	4,269	0,566	0,675
Estradiol 10nM	23,105	19,525	3,58	-0,123	1,089
24h Ø Hormon	23,154	18,762	4,383	0	1
24h DHT 1nM	23,925	18,007	5,913	1,08	0,473
Cortisol 500nM	23,08	19,042	4,038	-0,345	1,270
Estradiol 10nM	23,87	19,124	4,746	0,363	0,778
48h Ø Hormon	23,21	18,375	4,835	0	1
48h DHT 1nM	25,135	19,681	5,454	0,619	0,651
Cortisol 500nM	23,185	18,721	4,464	-0,371	1,293
Estradiol 10nM	24,315	19,062	5,253	0,418	0,748
72h Ø Hormon	23,24	19,053	4,187	0	1
72h DHT 1nM	24,71	18,316	6,394	2,207	0,216
Cortisol 500nM	22,38	18,682	3,698	-0,489	1,403
Estradiol 10nM	25,385	19,826	5,559	1,372	0,386

Tabelle 8: TaqMan®- PCR Ergebnisse für IGF-II- Rezeptor

Bedingung	C _T IGF-II- Rezeptor	C _T GAPDH	Δ- C _T	ΔΔ-C _T	2 ^{ΔΔ-CT}
2h Ø Hormon	25,96	18,776	7,184	0	1
2h DHT 1nM	24,665	18,985	5,68	-1,504	2,836
Cortisol 500nM	26,757	19,013	7,744	0,56	0,678
Estradiol 10nM	25,605	18,747	6,858	-0,326	1,253
4h Ø Hormon	25,335	19,149	6,186	0	1
4h DHT 1nM	24,955	18,786	6,169	-0,017	1,011
Cortisol 500nM	26,77	19,217	7,553	1,367	0,388
Estradiol 10nM	25,33	18,806	6,524	0,338	0,791
12h Ø Hormon	25,8	18,708	7,092	0	1
12h DHT 1nM	25,16	18,786	6,374	-0,718	1,645
Cortisol 500nM	26,31	19,503	6,807	-0,285	1,218
Estradiol 10nM	26,58	18,97	7,61	0,518	0,698

24h Ø Hormon	26,39	19,411	6,979	0	1
24h DHT 1nM	24,64	18,757	5,883	-1,096	2,138
Cortisol 500nM	27,38	19,252	8,128	1,149	0,451
Estradiol 10nM	26,07	19,339	6,731	-0,248	1,188
48h Ø Hormon	25,355	19,116	6,239	0	1
48h DHT 1nM	25,31	19,867	5,443	-0,796	1,736
Cortisol 500nM	26,185	19,463	6,722	0,483	0,715
Estradiol 10nM	26,295	19,281	7,014	0,775	0,584
72hØ Hormon	25,89	19,756	6,134	0	1
72h DHT 1nM	24,26	18,757	5,503	-0,631	1,549
Cortisol 500nM	25,69	19,288	6,402	0,268	0,820
Estradiol 10nM	26,2	20,115	6,085	-0,149	1,035

Die mit dieser Methode nachgewiesenen Unterschiede in den relativen Expressionshöhen der Gene waren minimal, so dass sie als nicht signifikant angesehen werden müssen. Damit kann also keine Aussage über eine mögliche Genregulation in Abhängigkeit von den Steroidhormonen getroffen werden.

Die graphische Auswertung und Darstellung der TaqMan®- PCR- Ergebnisse ist in den folgenden Abbildungen (Abb. 9 bis Abb. 12) dargestellt.

Hier bezeichnet jeweils die Abszisse die Inkubationszeiten der einzelnen Hormone. Auf der Ordinate ist die relative Expressionshöhe dargestellt. Die Zahlen sind nach der oben beschriebenen vergleichenden C_T - Methode normiert und relativ zu der Probe ohne Hormon aufgezeichnet, wobei die Expression der Negativprobe immer den Wert 1 erhalten hat.

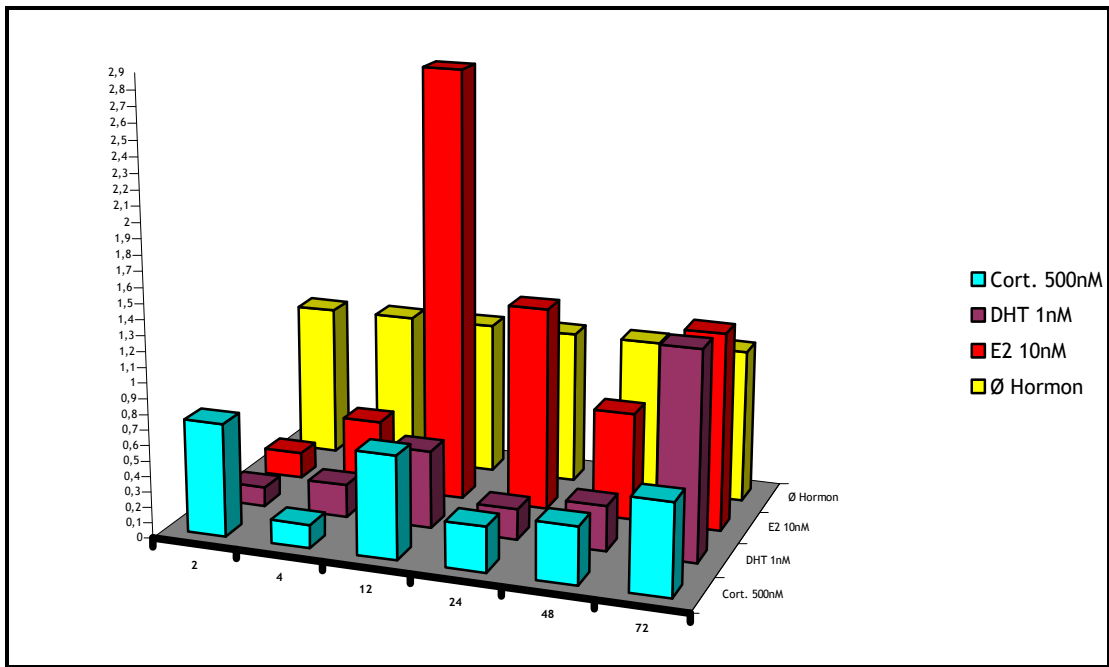


Abbildung 9: relative Expression des IGF-I- Gens

Die Abb. 9 zeigt die graphische Darstellung der Ergebnisse der Realtime- PCR mit der IGF-I- Sonde. Auf der Abszisse sind die Inkubationszeiten dargestellt. Die Ordinate zeigt die relative Expressionshöhe bezogen auf die basale Expression ohne Hormon. Die Hormone und Konzentrationen sind rechts im Bild aufgetragen.

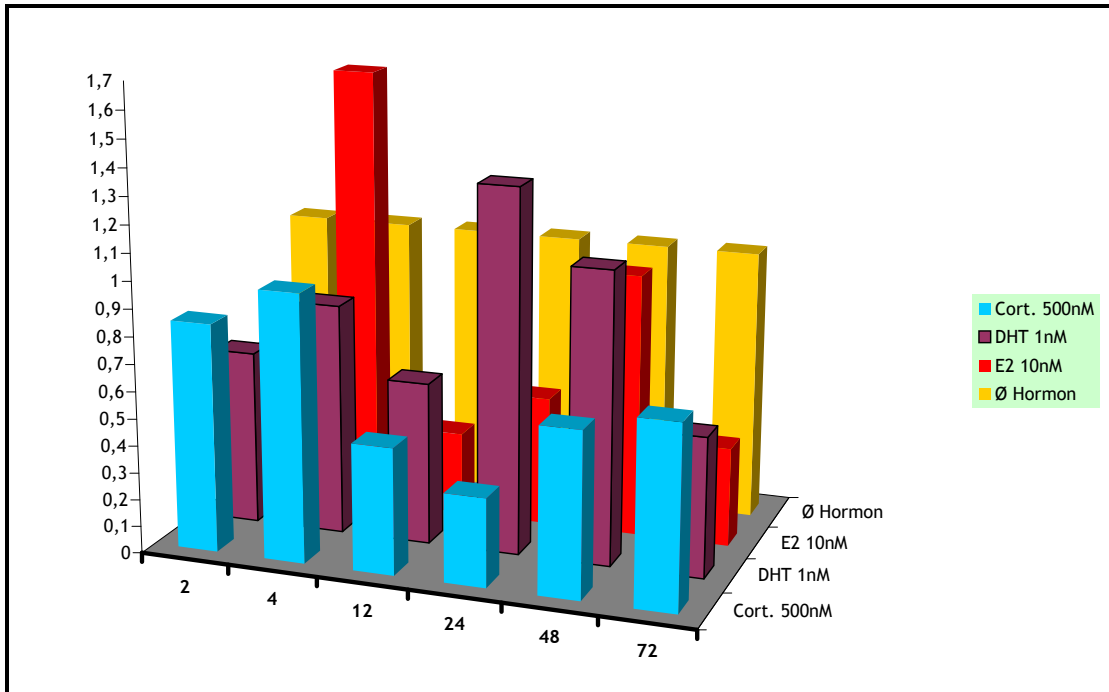


Abbildung 10: relative Expression des IGF-I Rezeptor- Gens

Die Abb. 10 zeigt die graphische Darstellung der Ergebnisse der Realtime- PCR mit der IGF-I Rezeptor- Sonde. Auf der Abszisse sind die Inkubationszeiten dargestellt. Die Ordinate zeigt die relative Expressionshöhe bezogen auf die basale Expression ohne Hormon. Die Hormone und Konzentrationen sind rechts im Bild aufgetragen.

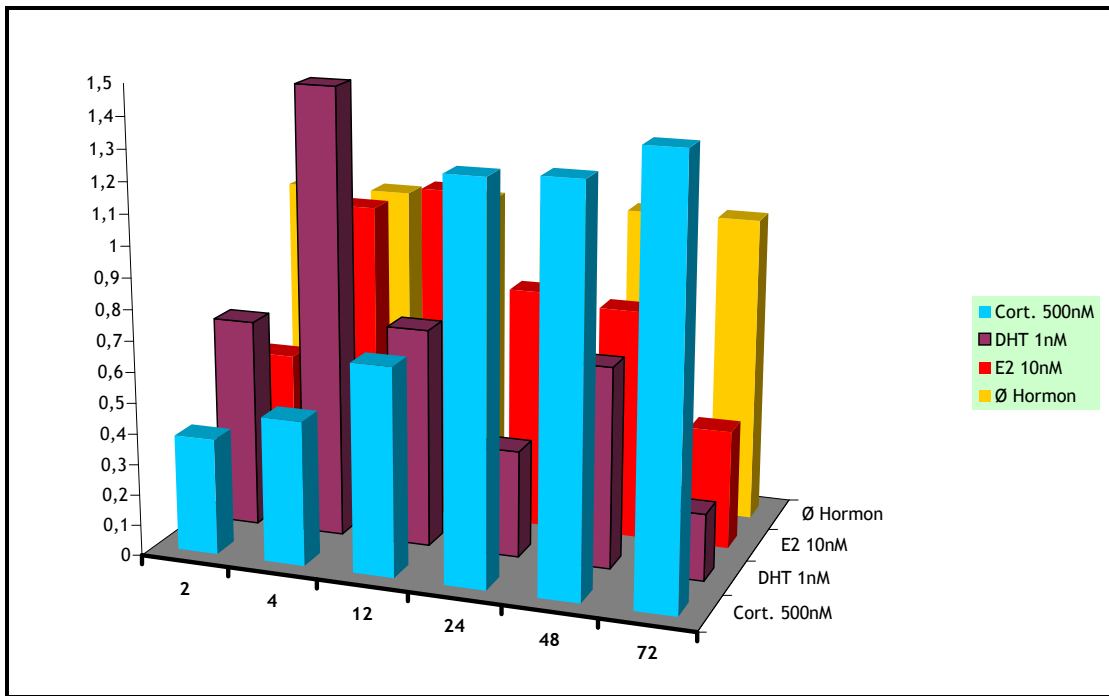


Abbildung 11: relative Expression des IGF-II- Gens

Die Abb. 11 zeigt die graphische Darstellung der Ergebnisse der Realtime- PCR mit der IGF-II- Sonde. Auf der Abszisse sind die Inkubationszeiten dargestellt. Die Ordinate zeigt die relative Expressionshöhe bezogen auf die basale Expression ohne Hormon. Die Hormone und Konzentrationen sind rechts im Bild aufgetragen.

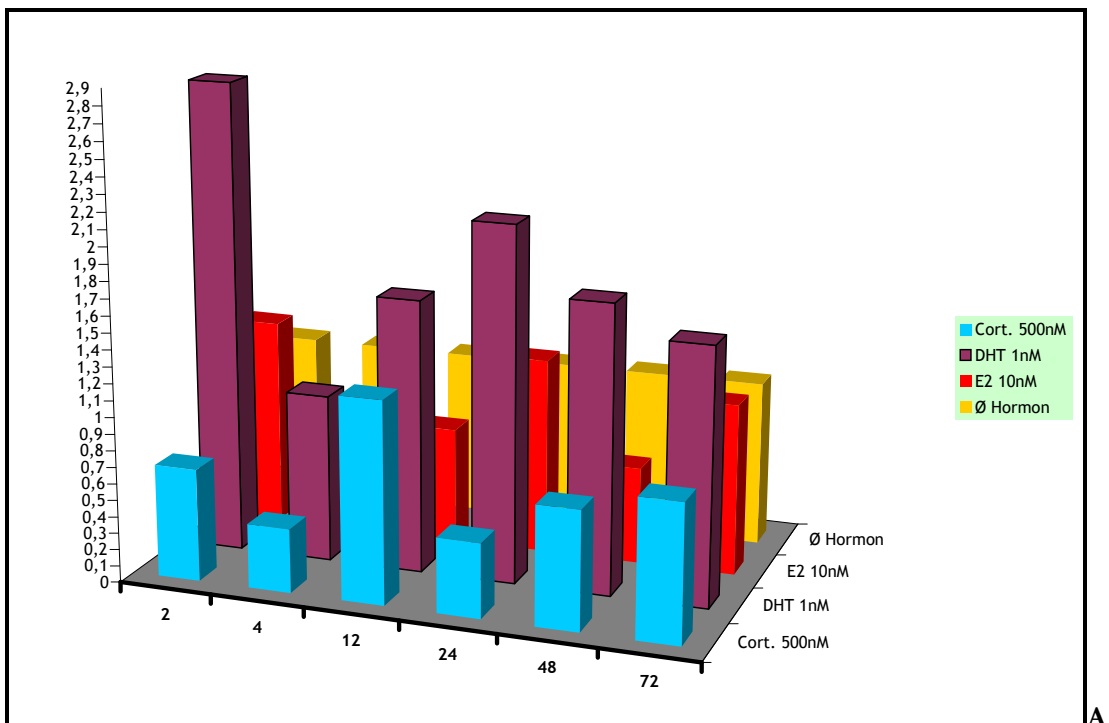


Abbildung 12: relative Expression des IGF-II Rezeptor- Gens

Die Abb. 12 zeigt die graphische Darstellung der Ergebnisse der Realtime- PCR mit der IGF-II Rezeptor- Sonde. Auf der Abszisse sind die Inkubationszeiten dargestellt. Die Ordinate zeigt die

relative Expressionshöhe bezogen auf die basale Expression ohne Hormon. Die Hormone und Konzentrationen sind rechts im Bild aufgetragen.

4 Diskussion

4.1 Zellkultur

In der Zellkultur zeigte sich eine Wachstumsförderung der humanen fetalen Lungenfibroblasten bei Inkubation mit Cortisol niedriger Konzentrationen und ein wachstumshemmender Einfluss auf die Fibroblasten beim Einsatz hoher Cortisolkonzentrationen. Es ist davon auszugehen, dass diese Wachstumseffekte auf eine Cortisolwirkung zurückzuführen sind, da sie in den Negativkontrollen ohne Hormonzusatz sowie in Gegenwart der anderen untersuchten Hormone nicht zu beobachten waren.

In der Literatur gibt es bisher keine Beschreibung dieses Phänomens an Lungenfibroblasten, jedoch wurde in Versuchen an humanen Hautfibroblasten unter Cortisoleinfluss ein Wachstumsverhalten dieser Zellen beschrieben, das dem der Lungenfibroblasten in unseren Versuchen ähnelt (Priestly G.C. 1978, Priestley G.C. und Brown J.C. 1980).

Es sind bisher in der Literatur keine Daten verfügbar, ob und inwiefern die Zellfunktionen durch die beobachteten Cortisoleffekte beeinflusst werden. Die Gesamt- RNA- Mengen und die Qualität der isolierten gesamt- RNA war bei allen Chargen vergleichbar, so dass davon auszugehen ist, dass durch die Effekte auf das Wachstum keine Beeinflussung der RNA-Produktion stattgefunden hat.

Auch ein hohes Alter der Fibroblasten kann zu denselben beschriebenen Phänomenen führen, die eine hohe Cortisolkonzentration hervorruft. Hayflick konnte bereits sehr früh anhand von embryonalen Lungenfibroblasten zeigen, dass diese nicht wie immortale (Tumor-) Zellen unsterblich sind, sondern nach einer bestimmten Zahl an Zellzyklen absterben (Hayflick 1968).

Um Artefakte, die sich möglicherweise aus diesem Alterungsprozess ergeben, zu vermeiden, wurden die Zellen einer Charge höchstens 8- 10 Wochen in Kultur gehalten. Damit ist davon auszugehen, dass ein entsprechend hohes Alter nicht erreicht wurde. In frühen Versuchen wurde beschrieben, dass humane Fibroblasten etwa 50-60 Verdopplungszyklen durchmachen können, was einer Kulturzeit im Labor von etwa 6-8 Monaten entspricht (Hayflick 1968).

Bei den übrigen untersuchten Hormonen (DHT und Estradiol) gab es keine Unterschiede im Wachstumsverhalten abhängig von Hormonzugabe oder Hormonkonzentration. Die Zellen waren vital und zeigten in allen Versuchen ein gleichmäßiges Wachstum in der Kultur. Dies

sowie auch die niedrige Passagestufe bei der Zellkultur sprechen für spezifische Cortisoleinflüsse auf das Zellwachstum. Diesen Beobachtungen wurde hier nicht weiter nachgegangen, systematische Untersuchungen des beschriebenen Phänomens sollten aber in Erwägung gezogen werden.

4.2 RNA- Analyse

Die aus den humanen Lungenfibroblasten isolierte RNA erwies sich bei der Überprüfung als rein und intakt. Sämtliche Gele zeigten die typischen rRNA- Banden, die, wie im Ergebnisteil beschrieben, Ausdruck reiner RNA sind (Abb. 3). Die gesamt- RNA ist somit in sehr guter Qualität isoliert worden. Im RNA- Midi Kit Handbuch finden sich Angaben, dass die ribosomale RNA 28S- Bande auf einer Höhe von 5,0 kb zu finden ist, und etwa doppelt so breit ist wie die ribosomale 18S- Bande, die sich auf einer Höhe von 1,9 kb befindet. Alle diese Qualitätsansprüche wurden von der gewonnenen RNA erfüllt. Ebenso sind alle beschriebenen Banden scharf begrenzt.

Regelmäßig fanden sich auf den Gelen zusätzliche RNA- Banden bei 10kb. Diese sind in der Literatur nicht explizit beschrieben. Es könnte sich hierbei um eine RNA- Spezies mit hohem Molekulargewicht handeln, die regelmäßig in den Zellen vorkommt. Ebenso gut könnte es sich auch um eine Verunreinigung handeln. Die Qualität der RNA ist jedoch nicht beeinträchtigt durch das Auftreten der zusätzlichen Bande. Zum einen ist eine spezifische RNA durch ihre Größe eindeutig zu identifizieren, zum anderen konnte die gesamte RNA durch Auftrennung im Formaldehydgel als intakt nachgewiesen werden. Durch die photometrische Messung und Erstellung des Quotienten der Absorptionen bei 260nm und 280nm konnte eine ausreichende Reinheit der isolierten RNA nachgewiesen werden.

Die in der Literatur angegebenen Ausgangszellzahlen, um eine signifikante RNA- Menge mit der hier gewählten Isolationsmethode zu erreichen, wurden in jeder Isolation erreicht.

Nach vorangegangenen Zählungen entsprechen 80% konfluent gewachsene Zellen in 175cm² Kulturflaschen einer Zellmenge von durchschnittlich $3 \cdot 10^6$ Zellen. Pro Isolierung wurden 6 Kulturflaschen benutzt. Damit wurde eine Gesamtzellmenge von durchschnittlich $1,8 \cdot 10^7$ Zellen erreicht. Dies liegt in dem im Handbuch angegebenen Bereich von $5 \cdot 10^6$ bis $1 \cdot 10^8$ Zellen (RNeasy Midi Handbook, Qiagen Februar 1997).

Ebenso stimmen die RNA- Mengen mit den in der Literatur beschriebenen Ausbeuten bei der verwendeten Methode überein. So entspricht bei der verwendeten Quantifizierungsmethode

die Absorption einer Einheit bei Messung gegen Wasser einer RNA- Menge von 40µg/ml. Um für den Northernblot eine ausreichende Menge RNA zur Verfügung zu haben, sollte die Konzentration nicht unter 2,18µg/µl liegen. Das war in allen Isolationen der Fall.

In der Literatur finden sich Angaben zum Gesamt- RNA- Gehalt für Lungengewebe bei der Maus in der Größenordnung von 130µg/10⁷ Zellen (Oligotex™ mRNA Handbuch, Qiagen November 1994). Damit liegt der Gesamt- RNA- Gehalt bei humanen Lungenfibroblasten unter dem des für Lungengewebe bei der Maus beschriebenen.

4.3 RT- PCR

Mittels reverser Transcription und einer anschließenden Polymerase Kettenreaktion (PCR) wurde nachgewiesen, dass alle untersuchten Wachstumsfaktoren des IGF- Systems in humanen fetalen Lungenfibroblasten exprimiert werden. Die Analyse der PCR- Produkte auf einem Agarosegel zeigte scharfe, spezifische Banden. Als PCR- Primer wurden die Primerpaare so gewählt, dass sie ein Intron der DNA überspannten. Auf dem Analysegel konnte so eine Verunreinigung mit DNA anhand der Produktgröße ausgeschlossen werden.

Die Expression von Wachstumsfaktorgenen des IGF- Systems in verschiedenen Geweben und verschiedenen Spezies wurde schon früher häufig beschrieben (siehe Tabelle 4). Jedoch fehlten bisher explizite Angaben über eine in- vitro- Expression der Gene des IGF- Systems in humanen fetalen Lungenfibroblasten. Jetzt konnte der qualitative Nachweis erbracht werden, dass in einer Zellkultur humaner fetaler Lungenfibroblasten die Gene, die für die Wachstumsfaktoren IGF-I, IGF-II, der IGF-I Rezeptor, der IGF-II Rezeptor, sowie die Bindungsproteine IGF-BP-2 und IGF-BP-3 kodieren, exprimiert werden.

Die Tatsache, dass eine mRNA für die Synthese dieser Faktoren nachgewiesen werden konnte, spricht dafür, dass diese Gene während der späten Fetalentwicklung aktiv sind, und somit möglicherweise eine Rolle bei der Differenzierung oder dem Wachstum der Lunge auch beim Menschen spielen. Eine wichtige Rolle bei der Lungendifferenzierung und Lungenreifung konnte für IGF-I und den IGF-I- Rezeptor bei Mäusen bereits nachgewiesen werden (Powell-Braxton et al. 1993, Liu et al. 1993).

Es konnte eine Expression der Wachstumsfaktorgene des IGF- Systems unabhängig vom Zusatz der Hormone gefunden werden. Daher ist davon auszugehen, dass die Faktoren in

ihrer Expression von der An- oder Abwesenheit von Steroidhormonen qualitativ nicht beeinflusst werden.

4.4 Northernblot

Im Laborhandbuch von Maniatis sind Gesamt- RNA Mengen zwischen 10 und 20µg für Northernblot- Untersuchungen empfohlen (Maniatis 1989). Es sind in der Literatur außerdem Analysen von Ratten- RNA im Northernblot beschrieben. Hier zeigten sich verwertbare Ergebnisse ebenfalls bei eingesetzten Mengen zwischen 10 und 20µg Gesamt- RNA nach Inkubationszeiten, die zwischen 14 Stunden bis 14 Tagen lagen (Wang et al. 1995, Wallen et al. 1994).

Für fetale Rattenlungenfibroblasten ist eine nach 48 Stunden erscheinende Bande einer IGF-II mRNA nach Inkubation der Fibroblasten mit 10^{-7} M Dexamethason beschrieben (Mouhieddine 1996). Es ist davon auszugehen, dass Corticosteroide eine Wirkung auf die Expression von IGF-II- Genen in Lungenfibroblasten haben. Eine Induktion von Genen des IGF- Systems ist darüber hinaus vom selben Autor für Pneumozyten Typ II in Zellkultur beschrieben. So wird in Pneumozyten Typ II durch Dexamethason nach 48 Stunden eine dosisabhängige Induktion einer IGF-II mRNA, sowie einer IGF-BP-2 mRNA gefunden. Die regulatorischen Effekte durch das Corticosteroid spielen sich auf Transkriptionsebene ab. Sie finden sowohl in den Fibroblasten als auch in den Pneumozyten Typ II statt. Die molekularen Mechanismen, die hierbei ablaufen, sind bisher unbekannt.

An Rhesusaffen wurde das spezielle Expressionsmuster der IGF- Familie untersucht. Dieses Modell ist aufgrund seiner Ähnlichkeit zum Menschen besonders gut geeignet, um Vergleiche anzustellen. In einer Längsschnittstudie, bei der in jedem Trimenon unterschiedliche Gewebe auf die Expression von Genen des IGF- Systems untersucht wurden, konnte in der Lunge von Rhesusaffen IGF-II im mesenchymalen Gewebe nachgewiesen werden (Lee et al. 2001). Der Nachweis erfolgte durch in situ- Hybridisierung. Die Expression in den mesenchymalen Zellen war gering, während in den Endothelien der Pulmonalarterien hohe Expressionsniveaus von IGF-II nachgewiesen werden konnten. Mit zunehmender Lungenreifung zum Ende der Schwangerschaft nahm das Expressionsniveau von IGF-II in den mesenchymalen Zellen ab.

Bisher sind für die untersuchten mRNAs verschiedene Banden im Northernblot gefunden worden (Tabelle 4). Dies deutet darauf hin, dass durch verschiedene RNA- Prozeduren

unterschiedlich große mRNAs entstehen. Eine andere Ursache kann eine unterschiedliche Expression der genomischen DNA bei unterschiedlichen Spezies oder in verschiedenen Entwicklungsstadien sein. Dies führt dazu, dass in unterschiedlichen Geweben einer Spezies oder in gleichen Geweben unterschiedlicher Spezies verschieden große mRNAs gefunden werden. Ebenso variiert die im Northernblot detektierte RNA abhängig vom Entwicklungsstand des jeweiligen Gewebes.

Für das IGF-I- Gen wurden RNA- Spezies von 1,4kb und bei 7,6kb beschrieben (Nagaoka et al. 1990, Höppener et al. 1988). Diese RNAs fanden sich in adultem Lebergewebe. In fetalem Gewebe ließen sie sich nicht zeigen.

Für das IGF-II- Gen sind in der Literatur RNA- Spezies von 1-1,2kb beschrieben (Wallen und Han 1994). In fetalem Lungengewebe fanden sich bei der Ratte Banden bei 1,0kb im Northernblot.

IGF-I Rezeptor mRNAs wurde bisher im Northernblot nicht beschrieben.

Für den IGF-II Rezeptor ist eine einzige RNA- Spezies beschrieben, deren Bande im Northernblot bei 9,0-9,5kb zu finden ist (Melnick et al. 1996).

In fetalem Gewebe sind im Northernblot für IGF-BP-2 Banden im niedermolekulargewichtigen Bereich zwischen 1,4kb und 1,8kb beschrieben (El- Roeiy et al. 1994, Batchelor et al. 1995, Wallen et al. 1997).

Es wäre demnach denkbar, eine RNA in den humanen fetalen Lungenfibroblasten zu detektieren, die zuvor nicht beschrieben wurde.

Es ließen sich jedoch keine spezifischen Banden auf den Blots nachweisen. Die Banden, die im hochmolekularen Bereich auf den Blots zu sehen sind, sind als nicht spezifisch anzusehen, da sie in gleicher Intensität auch auf den Blots, die mit der 18S- Sonde hybridisiert wurden zu erkennen sind. Hieraus ist auf ein unspezifisches Produkt zu schließen.

Der wahrscheinlichste Grund, dass keine spezifischen Banden nachweisbar waren, ist, dass die spezifische mRNA- Konzentration nicht ausreichend war, um im Northernblot detektiert zu werden.

Liegt der mRNA- Anteil der nachzuweisenden Wachstumsfaktoren am gesamt- RNA- Anteil unter 0,1%, ist es notwendig, mRNA direkt einzusetzen.

Hierfür spricht, dass der gesamt- RNA- Gehalt der humanen fetalen Lungenfibroblasten unter dem in der Literatur für Mauslungengewebe angegebenem gesamt- RNA- Gehalt lag.

Betrachtet man die Versuchsergebnisse vor dem Hintergrund anderer Untersuchungen, bei denen die Wachstumsfaktoren des IGF- Systems direkt im Lungengewebe nachgewiesen wurden, finden sich Ergebnisse, die ebenfalls diese These stützen: Immunhistochemische Untersuchungen von humanen Lungen aus Spätaborten konnten zeigen, dass IGF-I in unterschiedlichen Lungenanteilen abhängig vom Gestationsalter in unterschiedlicher Höhe exprimiert wird. In der 18. Gestationswoche konnte IGF-I im undifferenzierten Mesenchym und im kubischen Epithel nachgewiesen werden. Mit zunehmendem Gestationsalter nahm die Expression von IGF-I ab. Eine deutlich geringere Intensität der Expression wurde in der 21. Gestationswoche im Mesenchym gefunden. In der 24. Gestationswoche war nur noch eine geringe Expression im Epithel nachweisbar. Im Mesenchym ließ sich IGF-I zu dem Zeitpunkt nicht mehr nachweisen (Chetty et al. 2004).

Diese Beobachtungen decken sich gut mit den im Ergebnisteil dargestellten Ergebnissen (Abb. 6a/b, 7a/b, 8a/b). Bei den untersuchten humanen Lungenfibroblasten handelt es sich um Zellen der 20. Gestationswoche. Wie bei Chetty et al. 2004 beschrieben, wurde eine Expression von IGF-I in Lungen dieses Gestationsalters auch im Mesenchym gefunden. Die allgemein niedrigen Expressionslevel und die Abnahme der Expression mit zunehmendem Gestationsalter könnten erklären, warum ein Nachweis von IGF-I in der PCR gelang, der Nachweis im Northernblot jedoch nicht erbracht werden konnte. Die Nachweismethode des Northernblot ist nicht sensitiv genug, um die kleinen IGF- mRNA Mengen zu detektieren.

Ähnliche Beobachtungen wurden schon zuvor auch für weitere Komponenten des IGF- Systems an unterschiedlichen Spezies gemacht.

Der Nachweis von IGF-I mRNA aus fetalen Schaflungen gelang ebenfalls nicht im Northernblot, trotz langer Expositionszeiten von 14 Tagen. In diesen Versuchen gelang es, die mRNA mittels Slot- Blot- Analyse nachzuweisen. Die Sensitivität des Northernblot war zu gering, um die mRNA zu detektieren (Joe et al. 1997).

Auch bei der Ratte und Maus sind nur geringe, im Northernblot teilweise nicht detektierbare Expressionshöhen von IGF-II und IGF-BP-2 in Lungenfibroblasten, knapp vor der Geburt, beschrieben (Batchelor et al. 1995, Schuller et al. 1995). Ein Nachweis von IGF-BP-2 mRNA im Northernblot konnte bei Rattenlungenfibroblasten bereits geführt werden, jedoch ohne den Nachweis einer Regulation (Mouhieddine et al. 1995).

Da die Sensitivität des Northernblot als zu gering angesehen werden muss, um die Frage nach der Regulierbarkeit des IGF- Systems durch Steroidhormone zu beantworten, muss eine sensitivere Methode zum quantitativen Nachweis gewählt werden.

4.5 TaqMan- PCR

Während im Northernblot erst eine Signalzunahme um das 100fache des Ausgangswertes als signifikant anzusehen ist, gilt bei der TaqMan- PCR schon eine Zunahme um das 5fache des Vergleichswertes als hinreichend signifikant.

Mit der RT-PCR- Methode war es gelungen, die RNA der Wachstumsfaktoren in den Lungenfibroblasten nachzuweisen, die Wachstumsfaktoren werden demnach in den Lungenfibroblasten exprimiert. Die Frage, ob eine Regulation durch Steroidhormone stattfindet, konnte im Northernblot aufgrund zu geringer Sensitivität nicht beantwortet werden.

Die TaqMan®- PCR ist eine hocheinsensitive Methode, mit der Nukleinsäuren nachgewiesen werden können.

Bisher gibt es keine Voruntersuchungen der Gene des IGF- Systems aus fetalen Lungen mit der Realtime- PCR- Methode, so dass diese Ergebnisse nicht vor dem Hintergrund früherer Untersuchungen mit dieser Methode diskutiert werden können. Jedoch konnte durch immunhistochemische Verfahren der Nachweis erbracht werden, dass IGF-I und der IGF-I Rezeptor im Lungengewebe in vivo beim Menschen während der Fetalentwicklung exprimiert werden. Bis zur 20.SSW findet sich eine IGF-I- Expression vor allem in mesenchymalem Gewebe, nach der 20. SSW nimmt die Expression in mesenchymalem Gewebe ab, und relativ hierzu in epithelalem Gewebe zu (Chetty et al. 2004). Der IGF-I Rezeptor, der Hauptrezeptor für IGF-I, konnte in durchgängig geringer Konzentration hauptsächlich im Mesenchym des humanem Lungengewebes von der 14. SSW bis zum Ende der Schwangerschaft gefunden werden (Chetty et al. 2004).

Dieses Verteilungsmuster von IGF-I und IGF-I Rezeptor lässt auf eine parakrine Wirkung des IGF-I gegen Ende der Schwangerschaft schließen, wobei IGF-I vorwiegend im Epithel gebildet wird und über den IGF-I- Rezeptor auf das Mesenchym wirkt.

Die Expressionshöhen der Wachstumsfaktor- mRNA des IGF- Systems in humanen fetalen Lungenfibroblasten nach Behandlung mit Steroidhormonen sind, relativ zur Expressionshöhe ohne Hormon, nicht signifikant unterschiedlich. Es kann also nicht von einer Regulation der Expression der Gene von IGF-I, IGF-II, IGF-I Rezeptor und IGF-II Rezeptor durch DHT

in einer Konzentration von 1nM, Cortisol in einer Konzentration von 500nM oder Estradiol in einer Konzentration von 10nM zu dem untersuchten Entwicklungszeitpunkt (21. SSW) bei normaler Entwicklung ausgegangen werden.

Allerdings muss zu diesen Ergebnissen kritisch angemerkt werden, dass ein Beweis, dass mit der TaqMan®- PCR tatsächlich die Wachstumsfaktorgene des IGF- Systems nachgewiesen wurden, aus zeitlichen Gründen nicht erbracht wurde. Es ist hinreichend wahrscheinlich, dass die Primer spezifisch waren. Die Spezifität der Methode beruht darauf, dass die Primer möglichst nah beieinander liegen, und dass es nur dann zu einer Hydrolyse der Sonde durch die Ampli- Taq- DNA- Polymerase kommt, wenn Sonde und Template sequenzspezifisch gebunden haben. Jedoch ist die Nachweismethode der TaqMan®- PCR extrem sensitiv, und Wachstumsfaktoren weisen eine große Homologie der Sequenzen auf. Eine Amplifikation unspezifischer Nebenprodukte ist zwar unwahrscheinlich, jedoch kann sie nicht sicher ausgeschlossen werden.

Die hier dargestellten Ergebnisse stellen jedoch nur Momentaufnahmen eines komplexen und dynamischen Entwicklungsvorgangs dar. Es ist nicht auszuschließen, dass IGF zu einem anderen Zeitpunkt der Lungenentwicklung eine Rolle spielt. Zumindest scheint es eine wichtige Rolle in der Pathogenese der bronchopulonalen Dysplasie und des Atemnotsyndroms zu spielen (Chatty et al. 2004).

Möglicherweise findet auch eine nicht mesenchymvermittelte Regulation der normalen Lungenreifung über das IGF- System statt. Diese Frage könnten weiterführende Versuche an Pneumozyten beantworten.

5 Zusammenfassung

Die Ausbildung eines, die Oberflächenspannung in der Lunge herabsetzenden Glycolipidfilms (Surfactant), findet in der Spätschwangerschaft statt. Seine Synthese und Sekretion wird durch Steroidhormone reguliert. Auf molekularer Ebene spielen hier Wechselwirkungen zwischen dem Mesenchym und den surfactant- produzierenden Epithelzellen eine Rolle. Es ist ein vom Mesenchym gebildeter so genannter „Fibroblasten- Pneumozyten Faktor“ beschrieben. Seine Proteinstruktur konnte jedoch bisher nicht aufgeklärt werden.

Es gibt Hinweise darauf, dass eine Regulation des FPF durch Steroidhormone auch über das IGF- System vermittelt wird. Das IGF- System spielt eine wichtige Rolle beim Wachstum und bei Differenzierungsprozessen. Es konnte in der sich entwickelnden Lunge zahlreicher Säugetierspezies sowie beim Menschen nachgewiesen werden. Es gibt zwei für Wachstum und Differenzierung wichtige Regelachsen des IGF- Systems. Zum einen ist dies die Achse IGF-I, IGF-I Rezeptor und IF-BP-3, zum anderen ist es die Achse aus IGF-II, IGF-II Rezeptor und IGF-BP-2. Die Wirkungsweise ist auto-, para- und endokrin.

In dieser Arbeit gelang durch Nachweis einer mRNA der untersuchten Faktoren der Beweis, dass diese Gene beim Menschen in Lungenfibroblasten des 2. Trimenon der Schwangerschaft exprimiert werden. Durch quantitative Methoden konnte gezeigt werden, dass die Expressionsmengen dieser mRNA in vitro sehr gering sind. Diese Beobachtungen decken sich mit schon früher beschriebenen Beobachtungen aus in vivo- Versuchen, in denen bei verschiedenen Spezies - den Menschen inbegriffen - nur geringe Mengen der IGF- Faktoren durch in vitro- Hybridisierung und immunhistochemische Methoden gefunden wurden.

Mittels Northernblotexperimenten gelang aus diesem Grund kein Nachweis einer Regulation der untersuchten Komponenten des IGF- Systems. Um die postulierte Regulation der IGF- Komponenten durch Steroidhormone nachzuweisen, wurde als sensitivere quantitative Methode die Realtime PCR gewählt. Durch die Wahl und Platzierung der Primer sowie durch die Sonde erhält diese Methode ihre Spezifität. Mittels diese Methode gelang der quantitative Nachweis der mRNA, jedoch zeigte sich keine Abhängigkeit der mRNA- Menge von der An- oder Abwesenheit der Steroidhormone.

Die untersuchten Faktoren des IGF- Systems werden in humanen fetalen Lungenfibroblasten exprimiert. Es findet aber zum untersuchten Zeitpunkt keine Regulation durch Steroidhormone auf mRNA- Ebene in diesen Zellen statt.

6 Literaturverzeichnis

Adamson IYR, Bakowska J, McMillan E, King GM Accelerated Fetal Lung Maturation by Estrogen is associated with an Epithelial- Fibroblast Interaction

In Vitro Cell Dev Biol 26: 784-790; 1990

Batchelor DC, Hutchins AM, Klempt M, Skinner SJM Developmental changes in the expression patterns of IGFs, type I IGF receptor and IGF- binding proteins- 2 and -4 in perinatal rat lung

J Mol Endocrinol 15: 105-115; 1995

Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB Nelson Textbook of Pediatrics, 16th Edition; Harcourt Verlag, London 2000

Braulke T, Götz W, Claussen M Immunohistochemical Localization of Insulin-like Growth Factor Binding Protein -1, -3 and -4 in Human Fetal Tissues and their Analysis in Media from Fetal Tissue Explants

Growth Regul 6: 55-65; 1996

Butler AA, LeRoith D Minireview: Tissue- specific Versus Generalized Gene Targeting of the IGF-I and IGF-I receptor Genes and their Roles in Insulin- Like Growth Factor Physiology

Endocrinology 142: 1685-1688; 2001

Chetty A, Anderson S, Lassus P, Nielsen HC Insulin- Like Growth Factor-I (IGF-I) and IGF-I Receptor (IGF-I R) Expression in Human Lung in RDS and BPD

Pediatric Pulmonology 37: 128-136; 2004

DeChiara TM, Efstratiadis A, Robertson EJ A growth- deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin- like growth factor II gene disrupted by targeting Nature 345: 78-80; 1990

De-Lemos RA, Sherneta DW, Knelson JH, Kotas R, Avery ME Acceleration of Appearance of Pulmonary Surfactant in the Fetal Lamb by Administration of Corticosteroids
Am Rev Resp Dis 102:159; 1970

El- Roeiy A, Chen X, Roberts VJ, Shimasaki S, Ling N, LeRoith D, Roberts CT, Yen SSC, Yen JR Expression of the Genes Encoding the Insulin- Like Growth Factors (IGF-I and -II), the IGF and Insulin Receptors, and IGF- Binding Proteins- 1-6 and the Localization of Their Gene Products in Normal and Polycystic Ovary Syndrome Ovaries
J Clin Endocrinol Metabolism 78: 1488-1496; 1994

Hayflick L Human Cells and Aging
Scientific American; 1968

Höppener JWM, Mosselman S, Roholl PJM, Lambrechts C, Slebos RJC, de Pagter-Holthuizen P, Lips CJM, Jansz HS, Sussenbach JS Expression of insulin like growth factor -I and -II genes in human smooth muscle tumours
The EMBO Journal 7: 1379-1385; 1988

Joe P, Wallen LD, Chapin CJ, Lee CH, Allen L, Han VK, Dobbs LG, Hawgood S, Kitterman JA Effects of mechanical factors on growth and maturation of the lung in fetal sheep
Am J Physiol 272 (Lung Cell Mol Physiol 16): L95-L105; 1997

Lamson G, Giudice LC, Rosenfeld RG Mini Review: Insulin- Like Growth Factor Binding Proteins: Structural and Molecular Relationships
Growth Factors 5: 19-28; 1991

Lee CI, Goldstein O, Han VKM, Tarantal AF IGF-II and IGF Binding Protein (IGF-BP-1, IGF-BP-3) gene expression in fetal rhesus monkey tissues during the second and third trimesters
Pediatric Research 49: 379-387; 2001

Liggins GC, Howle RN A controlled Trial of Antepartum Glucocorticoid Treatment for Prevention of the Respiratory Distress Syndrome in Premature Infants
Pediatrics 50: 515-525; 1972

Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A Mice Carrying Null Mutations of the Genes Encoding Insulin- Like Growth Factor I and Type 1 IGF Receptor
Cell 75: 59-72; 1993

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J Molecular Cloning. A Laboratory Manual 2nd edition,
Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989

Melnick M, Chen H, Rich KA, Jaskoll T Developmental Expression of Insulin- Like Growth Factor II Receptor in Congenic Mouse Embryonic Lungs: Correlation Between IGF-II Receptor mRNA and Protein Levels and Heterochronic Lung Development
Molecular Reproduction and Development 44: 159-170; 1996

Moats-Staats B, Price WA, Xu LJH, Siles AD Regulation of the IGF- System during normal rat lung development
Am J Respir Cell Mol Biol 12: 56-64; 1995

Mouhieddine OB, Cazals V, Kuto E, Le Bouc Y, Clement A Glucocorticoid- Induced Growth Arrest of Lung Alveolar Epithelial Cells is Associated with Increased Production of Insulin- Like Growth Factor Binding Protein- 2
Endocrinology 137: 287-295; 1996

Mullis KB, Faloona, FA Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase- catalysed chain reaction
Methods Enzymol 155: 335-350; 1987

Nagaoka I, Trapnell BC, Crystal RG Regulation of Insulin- Like Growth Factor I Gene Expression in the Human Macrophage- Like Cell Line U937
J Clin Invest 8: 448-455; 1990

Oligotex™ mRNA Handbuch for purification of poly A+ RNA from total RNA, purification of polyadenylated in vitro transcripts; Qiagen 1994

de Pagter- Holthuizen P, Jansen M, van der Kammen RA, van Schaik FMA, Sussenbach JS Differential expression of the human insulin- like growth factor II gene. Characterization of the IGF- II mRNAs and an mRNA encoding a putative IGF- II-associated protein
Biochimica et Biophysica Acta 950: 282-295; 1988

de Pagter- Holthuizen P, Jansen M, Bovenberg W, van den Brande JL, Sussenbach JS The human somatomedin/ insulin- like growth factor genes: organization and development- specific expression
Journal of Internal Medicine 225: 37-42; 1989

Powell- Braxton L, Hollingshead P, Warburton C, Dowd M, Pitts- Meek S, Dalton D, Gillett N, Stewart TA IGF-I is required for normal embryonic growth in mice
Genes and Development 7: 2609-2617; 1993

Price WA Peptide Growth Factors Regulate Insulin- Like Growth Factor Binding Protein Production by Fetal Rat Lung Fibroblasts
Am J Respir Cell Mol Biol 20: 332-341; 1999

Priestly GC Effects of corticosteroids on the growth and metabolism of fibroblasts cultured from human skin
Br J Dermatol 3: 253-261; 1978

Priestley GC, Brown JC Effects of corticosteroids on the proliferation of normal and abnormal human connective tissue cells
Br J Dermatol 1: 35-41; 1980

QIAprep Miniprep Handbook for purification of Plasmid DNA; Qiagen 1998

Rneasy Midi Handbook for RNA Midipreps from Animal Tissue, Animal Cells, Bacteria Yeast; Qiagen 1997

Rotwein P Two insulin- like growth factor I messenger RNAs are expressed in human liver
Proc Natl Acad Sci USA 83: 77-81; 1986

Rotwein P Structure, Evolution, Expression and Regulation of Insulin- Like Growth Factors
I and II
Growth Factors 5: 3-18; 1991

Schuller AGP, van Neck JW, Beukenholdt RW, Zwarthoff EC, Drop SLS IGF, type I
IGF receptor and IGF- binding protein mRNA expression in the developing mouse lung
J Mol Endocrinol 14: 349-355; 1995

Smith BT Lack of Species Specificity in Production of Fibroblast- Pneumocyte Factor by
Perinatal Lung Fibroblasts
Physiological and Biochemical Basis for Perinatal Medicine. Samuel Z. Levine Conf. 1st Int.
Meeting, Paris 54-58; 1979 (Karger, Basel 1981)

Stahl F, Amendt P, Dörner G Total and Free Cortisol Plasma Levels in Pre- and Postnatal
Life
Endokrinologie Band 74, Heft 2; 1979

Torday JS Androgens Delay Human Fetal Lung Maturation in vitro
Endocrinology 126: 3240-3244; 1990

Torday JS, Kourembanas S Fetal Rat Lung Fibroblasts Produce a TGF- β Homolog That
Blocks Alveolar Type II Cell Maturation
Developmental Biology 139: 35-41; 1990

Tropper PJ, Warren WB, Jozak SM, Conwell IM, Stark RI, Goland RS Corticotropin
Releasing Hormone Concentrations in Umbilical Cord Blood of Preterm Fetuses
J Dev Physiol.18: 81-85; 1992

Wallen LD, Han VK Spatial and temporal distribution of insulin- like growth factors I and II during development of rat lung
Am J Physiol 267 (Lung Cell Mol Physiol 11): L531-L542; 1994

Wallen LD, Myint W, Nygard K, Shimasaki S, Clemmons DR, Han VK Cellular distribution of insulin- like growth factor binding protein mRNAs and peptides during rat lung development
Journal of Endocrinology 155: 313-327; 1997

Wang J, Kuliszewski M, Yee W, Sedlackova L, Xu J, Tseu I, Post M Cloning and Expression of Glucocorticoid- induced Genes in Fetal Rat Lung Fibroblasts
The Journal of Biological Chemistry 270: 2722-2728; 1995

Weimann E, Kiess W Grundlagen der klinischen Bedeutung der Insulin- like Growth Factors/ Somatomedine
Klin Wochenschr 68: 985-1002; 1990

7 Anhang

7.1 Zusammensetzung der nicht kommerziell erworbenen Medien und Lösungen

- DEPC- Wasser 1l destilliertes Wasser mit 1ml DEPC
(Diethylpyrocarbonat; Fa. Sigma- Aldrich) versetzen,
autoklavieren
- 15% Agarose- Formaldehydgel 15% Agarose (Gibco BRL)
10% 10x MOPS- Puffer
5% Formaldehyd 37%, pH 4,2 (Fa. Merck)
in DEPC- Wasser
- 10x MOPS- Puffer 200mM MOPS (Fa. Sigma)
50mM Na- Acetat (Fa. Merck)
10mM EDTA pH 8 (Fa. Sigma)
pH einstellen auf 7,0 mit NaOH (Fa. Merck)
- Sample- Buffer 1mM EDTA pH 8,0 (Fa. Sigma)
50% Glycerin (Fa. Sigma)
0,25% Bromphenolblau (Fa. Sigma)
0,25% Xylene Cyanole FF (Fa. Sigma)
- Probenpuffer RNA- Gel 1µl/Probe 10x MOPS
10µl/Probe Formamid 37%, deionisiert (Fa. Sigma)
3,5µl/Probe Formaldehyd pH 4,2 (Fa. Merck)
0,75µl/Probe Ethidiumbromid 1g/l (Fa. Merck)
2,1µl/Probe Sample- Buffer
- Bluestop- Puffer 0,25% Bromphenol Blau (Fa. Sigma)
0,25% Xylene Cyanole FF (Fa. Sigma)

- RT- Mix
 - 4µl/Probe 5-RT-Puffer (Gibco BRL)
 - 2µl/Probe DTT 100mM (Gibco BRL)
 - 1µl/Probe dNT 10Mm (Gibco BRL)
 - 1µl/Probe Rnasin (Gibco BRL)

- PCR- Mix
 - 1µl/Probe sense Primer
 - 1µl/Probe antisense Primer
 - 5µl/Probe 10x Puffer
 - 5µl/Probe dNTP 2mM (Fa. Pharmacia)
 - mit DEPC- Wasser auf 49µl auffüllen

- 10x Puffer für PCR
 - 500mM KCl (Fa. Merck)
 - 200mM Tris (Fa. Sigma)
 - 500mg/ml BSA (Fa. Sigma)
 - 50mM MgCl₂ (Fa. Merck)

- 5x TBE- Puffer
 - 54g Tris (Fa. Sigma)
 - 27,5g Borsäure (Fa. Merck)
 - 20ml 0,5M EDTA pH 8,0 (Fa. Sigma)

- LB- Medium pH 7,0
 - 1,0% NaCl (Fa. Merck)
 - 1,0% Pepton Select 140 (Fa. Gibco BRL)
 - 0,5% Yeast Extrakt (Fa. Gibco BRL)

- SOC- Medium
 - 2,0% Trypton (Fa. Gibco BRL)
 - 0,5% Yeast Extract (Fa. Gibco BRL)
 - 10mM NaCl (Fa. Merck)
 - 2,5mM KCl (Fa. Merck)
 - 10mM MgCl₂-6H₂O (Fa. Merck)
 - 20mM Glucose (Fa. Merck)

- STE- Puffer
 - 01,M NaCl (Fa. Merck)
 - 10mM Tris Cl pH 8,0 (Fa. Sigma)
 - 1mM EDTA pH 8,0 (Fa. Sigma)

- Northern- Mix
 - 1µl/Probe 10x MOPS
 - 10µl/Probe Formamid 37%, deionisiert (Fa. Sigma)
 - 3,5µl/Probe Formaldehyd pH 4,2 (Fa. Merck)
 - 2,1µl/Probe Sample- Buffer

- alkalische Lösung
 - 50mM Na- Hydroxyd (Fa. Merck)
 - 10mM NaCL (Fa. Merck)

- 2x KGB- Puffer
 - 200mM Kalium Glutamat (Fa. Sigma)
 - 50mM Tris-acetate pH 7,5 (Fa. Sigma)
 - 20mM Mg-acetate (Fa. Sigma)
 - 100µg/ml BSA (Fa. Sigma)
 - 1mM β-Mercaptoethanol (Fa. Sigma)

7.2 Darstellung des verwendeten Plasmidvektors

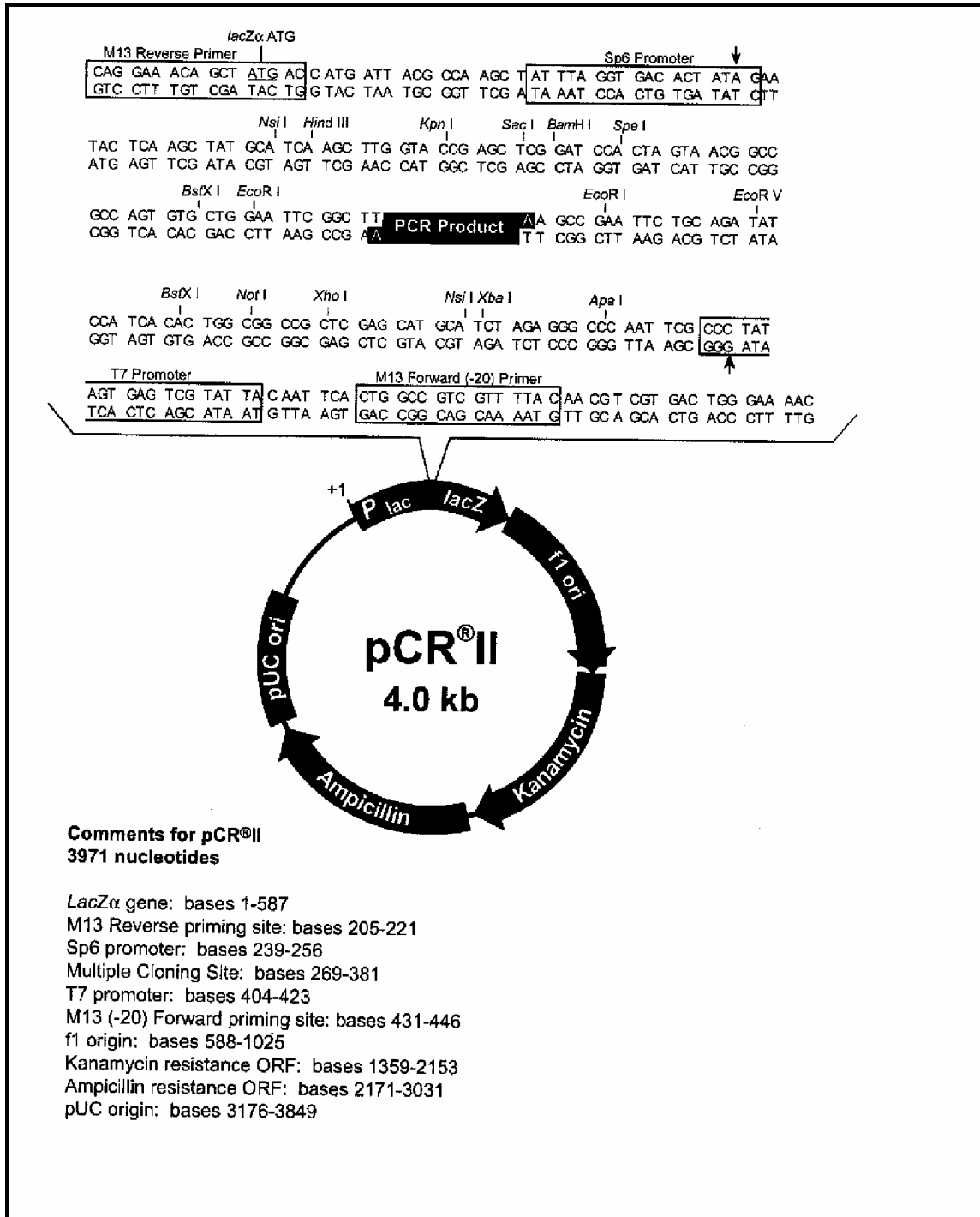


Abbildung 13: Plasmidvektor (mit freundlicher Genehmigung der Fa. Invitrogen)

8 Danksagung

Diese Arbeit entstand im Molekularendokrinologischen Labor (Leiter Prof. Dr. med. Olaf Hiort) in der Arbeitsgruppe von Dr. med. Esther Nitsche an der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Medizinischen Universität zu Lübeck.

Für die Unterstützung und den Rat bei der Durchführung der Untersuchungen sowie bei der Niederschrift dieser Arbeit danke ich:

Herrn Prof. Dr. med. Ludwig Gortner für die Überlassung des Themas und seinen Einsatz, der letztendlich zur Fertigstellung der Arbeit einen großen Beitrag geleistet hat.

Frau Nicole Bohnert für die Einarbeitung in die speziellen Arbeitstechniken, sowie für die Unterstützung bei der Durchführung der Versuche. Ohne sie wären die Versuche nicht zu bewältigen gewesen.

Herrn Winfried Wünsche aus dem Institut für Molekulare Medizin der Medizinischen Universität zu Lübeck für die Überlassung der Vakuum- Blot- Apparatur für die Versuche und Einarbeitung in die Blot- Technik.

Frau Petra Weyland für die gute Zusammenarbeit im Labor.

Herrn Jan Götte für die Hilfe beim Scannen und Bearbeiten der Fotos.

Frau Susanne Modrow vom Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Regensburg für konstruktive Kritik bei der Interpretation der Ergebnisse.

Frau Kristina Sommer und Herrn Sönke Sommer für das Korrekturlesen der Arbeit und die Hilfe bei der Anwendung der neuen Rechtschreibregelung.

meinen Freunden, besonders Herrn Ihne Schneider, Herrn Uwe Fohrmann und

Herrn Prof. Helmut v. Domarus, sowie meinen Eltern, die mich bei der Arbeit alle auf ihre Weise unterstützt haben.

Mein größter Dank gilt Herrn PD Dr. med. Hartwig Lehmann für die engagierte Übernahme der wissenschaftlichen Betreuung, sowie für die Hilfe bei der Fertigstellung und die zügige Korrektur der Arbeit.

9 Lebenslauf

Geburtsdatum: 08.12.1971
Geburtsort: Elmshorn
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schule

1978 – 1983 Grund- und Hauptschule in Brande- Hörnerkirchen
1983 – 1989 Realschule in Barmstedt
1989 – 1992 Fachgymnasium in Elmshorn
1992 Abitur

Berufsausbildung

1992 – 1994 Ausbildung zur Biologisch- technischen Assistentin an der Fachschule
Dr. Heinemann in Braunschweig
1994 Abschluss der Ausbildung mit dem Staatsexamen

Juli – Okt. 1994 Arbeit in der bakteriologischen Abteilung des medizinischen
Laboratoriums Dr. Kramer und Partner in Geesthacht

Hochschule

1994 - 2001 Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Universität zu Lübeck
1995 – 1999 Mitarbeit im Institut für Biochemie an der Medizinischen Universität
zu Lübeck in der Arbeitsgruppe von Dr. rer. nat. Anemüller, sowie im
biochemischen Praktikum
2001 bestehen der ärztlichen Prüfung

Tätigkeit als Ärztin

- 2001 – 2003 Assistenzärztin in der Abteilung für Orthopädie und Traumatologie am
Kantonalen Spital Altstätten, Schweiz
- Feb. 2003 Approbation als Ärztin
- seit Oktober 2003 Assistenzärztin in der Orthopädischen Klinik der Philipps- Universität
zu Marburg/ Lahn