

NONVIRALE TRANSFEKTION VON FIBROBLASTEN BEI RHEUMATOIDER ARTHRITIS

Inauguraldissertation
Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Christina Gruber, geb. Laux
aus Passau

Gießen 2010

Aus dem Lehrstuhl für Innere Medizin
mit Schwerpunkt Rheumatologie
Justus-Liebig Universität Giessen

Gutachter: Prof. Dr. Müller-Ladner

Gutachter: Frau Prof. Dr. Lips

Tag der Disputation: 07. Dezember 2010

Meiner Großfamilie

Markus, Josef, Johanna, Maria
und
Gerda, Annemarie, Alfons, Hans, Bernhard, Martin, Anita

Inhaltsverzeichnis

I. EINLEITUNG	1
1. Rheumatoide Arthritis	1
1.1. Krankheitsbild der rheumatoiden Arthritis	1
1.1.1. Synoviale Hyperplasie und Knorpeldestruktion	2
1.1.2. Entzündung	6
1.2. Klassifizierung der rheumatoiden Arthritis	7
1.3. Theorien zur Pathogenese der rheumatoiden Arthritis	9
1.4. Therapeutische Ansätze	11
II. FRAGESTELLUNG	14
III. MATERIAL UND METHODEN	15
1. Material	15
1.1. Chemikalien und Materialien	15
1.2. Zellen und Organismen	17
1.3. Oligonukleotide	17
1.4. Vektoren und Plasmide	19
1.6. Antikörper	19
1.7. Kits und Standards	19
1.8. Geräte	20
2. Methoden	21
2.1. Zellbiologische Methoden	21
2.1.1. Isolierung der Fibroblasten	21
2.1.2. Zellkultivierung	21
2.2. Herstellung der Plasmide für die Transfektion	22
2.2.1. Primerkonstruktion	22
2.2.2. PCR	22
2.2.3. Ligation und Klonierung	24
2.2.4. Flüssigkulturen	26
2.2.5. Plasmidisolierung	27
2.2.6. Plasmidverdau	27
2.2.7. M 13 –PCR	28
2.2.8. Maxi Plasmid Präparation	29
2.2.9. Plasmidfällung	30
2.2.10. Plasmidsequenzierung	30
2.2.11. Testung der Richtung des eingebauten Inserts	30
2.2.12. Plasmidverdau zum Einbau in den pcDNA3.1 Vektor	32
2.2.13. Gelextraktion des gewünschten Plasmidstücks	34
2.2.14. Ligation des Vektors pcDNA 3.1 mit dem Plasmidstück	35
2.2.15. Transformation und Klonierung mit obiger Ligation	37
2.2.16. Plasmidisolierung aus Bakterien mit integriertem pcDNA-Vektor	38
2.2.17. Alternative Strategie für den Einbau des IL-6 Inserts	38
2.3. Herstellung von RNA-Sonden zur Transfektion	42
2.3.1. Plasmidlinearisierung	42
2.3.2. RNA-Sonden Herstellung	42
2.4. Nonvirale Transfektion	43
2.4.1. Prinzip der Lipotransfektion	43
2.4.2. Transfektion von Fibroblasten mit RNA-Sonden und Effectene	45
2.4.3. Transfektion mit Plasmiden und diversen Liporeagenzien	47

Inhaltsverzeichnis

2.4.3.1. Transfektion mit Effectene™ der Firma QIAGEN®.....	47
2.4.3.2. Transfektion mit SuperFect™ der Firma QIAGEN®	49
2.4.3.3. Transfektion mit FuGENE 6™ der Firma Roche®	51
2.5. Nachweismethoden für die Transfektionen	53
2.5.1. IL-6 Elisa	53
2.5.2. RNA-Isolierung.....	55
2.5.3. RNA-Konzentrationsbestimmung	55
2.5.3.1. Ethidiumbromidplatten	55
2.5.3.2. RiboGreen™ RNA Quantitation Kit	55
2.5.4. RT-PCR.....	56
2.5.5. cDNA-Array	57
2.5.5.1. Puffer und Lösungen.....	57
2.5.5.2. Herstellung der Hybridisierungsprobe	57
2.5.5.3. Säulenaufreinigung	59
2.5.5.4. Hybridisierung.....	59
2.5.5.5. Waschen.....	60
2.5.5.6. Phosphorimaging	60
2.5.5.7. Auswertung mittels der Atlas™ 2.0 Software	60
2.5.5.8. Strippen der Membranen	61
2.5.6. Digoxigenin-AP-AK-Färbung zum Nachweis der markierten RNA-Sonden.....	62
2.5.6.1. Herstellung der markierten RNA-Sonden für die Transfektion	62
2.5.6.2. Immunhistologischer Nachweis	62
2.5.7. Transfektionen mit FuGENE™, superFect™ und Effectene™ und GFP-Plasmiden.....	63
2.5.8. Quantifizierung mittels Roche LightCycler.....	64
IV. ERGEBNISSE.....	67
1. Ergebnisse der Plasmidherstellung	67
1.1. Ergebnis der PCR	67
1.2. Ergebnis der Plasmidisolierung.....	68
1.3. Ergebnis des Plasmidverdaus.....	70
1.4. Ergebnis der M13-PCR	71
1.5. Ergebnis der Maxi Plasmid Präparation.....	72
1.6. Ergebnis der Testung der Richtung des eingebauten Inserts.....	73
1.7. Ergebnis des Plasmidverdaus zum Einbau in den pcDNA 3.1+ Vektor	74
1.8. Ergebnis der Ligation	76
1.9. Ergebnis der Plasmidisolierung.....	77
1.10. Ergebnis der alternativen Strategie für den Einbau des IL-6-Verdaus in den pcDNA-Vektor.....	79
1.10.1. Ergebnis der PCR mit neu konstruierten Primern.....	79
1.10.2. Ergebnis des enzymatischen Verdaus der PCR-Produkte und des pcDNA-Vektors.....	81
1.10.3. Ergebnis der Transformation und Klonierung der Bakterien mit dem pcDNA3.1.Vektor	82
2. Ergebnis der RNA-Sonden Herstellung	83
3. Ergebnisse der Transfektion	84
3.1. Ergebnis der Transfektion mit RNA und Effectene.....	84
3.2. Ergebnis der Transfektion mit Plasmiden und Effectene	93
3.3. Ergebnis der Transfektion mit Plasmiden und Fugene	98
3.4. Ergebnis des Arrays	102
3.5. Ergebnis der Quantifizierung mittels LightCycler	105
V. DISKUSSION.....	109
1. Diskussion der Methoden.....	109
1.1. Diskussion der Methoden zur Entwicklung von Plasmiden	109
1.2. Diskussion der Methoden zur RNA-Sondenherstellung.....	111
1.3. Diskussion der Methode der nonviralen Transfektion.....	112
1.3.1. Diskussion der nonviralen Transfektion mit RNA	112
1.3.2. Diskussion der nonviralen Transfektion von Plasmiden	112
2. Diskussion der Ergebnisse.....	113
2.1. Diskussion der Ergebnisse zur Plasmidherstellung	113

Inhaltsverzeichnis

2.2. Diskussion der Ergebnisse zur RNA-Sondenherstellung.....	114
2.3. Diskussion der Ergebnisse der Transfektion mit RNA-Sonden	115
2.4. Diskussion der Ergebnisse der Transfektion mit Plasmiden.....	115
VI. ZUSAMMENFASSUNG	117
VII. ABKÜRZUNGEN	118
VIII. REFERENZEN.....	121
IX. ANHANG	123

Einleitung

I. EINLEITUNG

1. Rheumatoide Arthritis

1.1. Krankheitsbild der rheumatoiden Arthritis

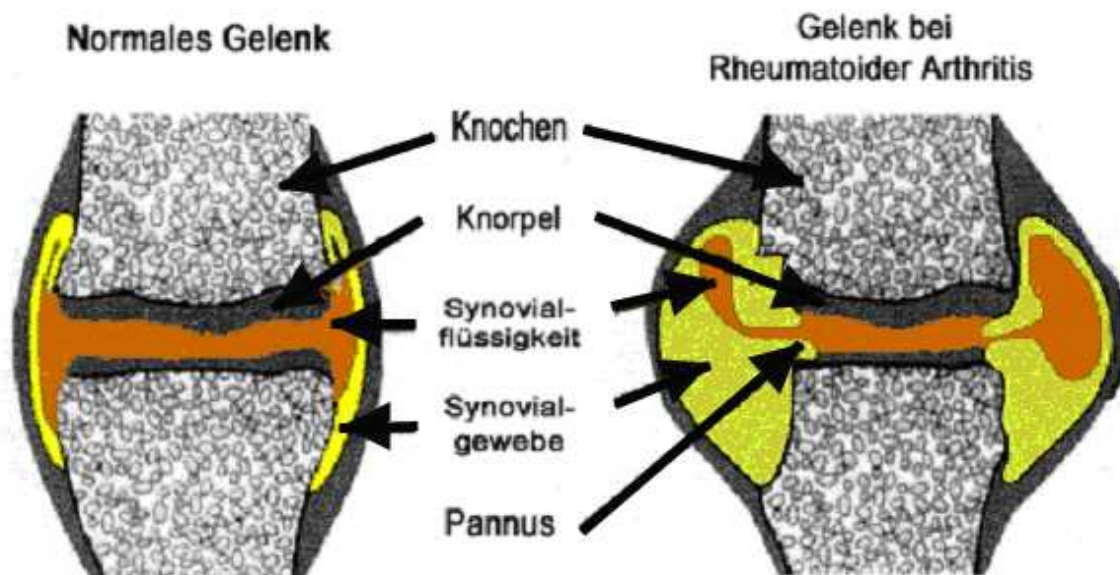
Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine der häufigsten chronisch entzündlichen Gelenkerkrankungen (Prävalenz ca. 0,8% der Bevölkerung), die durch eine progressive Destruktion der betroffenen Gelenke charakterisiert ist. Frauen sind ungefähr dreimal häufiger betroffen als Männer. Bei 2/3 der Patienten beginnt die Erkrankung schleichend mit Abgeschlagenheit und unbestimmten muskuloskelettalen Symptomen. Spezifische Symptome treten oft erst nach Wochen bis Monaten mit einer Synovialitis mehrerer Gelenke (insbesondere Finger-, Hand-, Knie- und Fußgelenke) bei meist symmetrischer Anordnung auf. Dies führt zu Schwellung, Druckschmerzhaftigkeit und Bewegungseinschränkung der betroffenen Gelenke. Die Gelenkschwellung resultiert aus der Ansammlung von Synovialflüssigkeit, der Hypertrophie der Synovia und der Verdickung der Gelenkkapsel. Anfänglich wird die Gelenkbeweglichkeit durch Schmerzen eingeschränkt, später führen fibröse oder knöcherne Ankylosen oder Weichteilkontrakturen zu einer dauerhaften Deformierung. Neben oft dramatischen Krankheitsfolgen für die Betroffenen, besitzt die RA auch eine sozialökonomische Bedeutung. Ohne Behandlung führt eine RA bei 50 % der Patienten innerhalb der ersten zwei Erkrankungsjahre zu einer dauerhaften Schädigung der betroffenen Gelenke (Firestein, 1998). Die Zahl der Arztbesuche und Krankenhausaufenthalte ist bei Patienten mit RA etwa doppelt so hoch wie bei der Normalbevölkerung. Somit gehört die RA unter Berücksichtigung der Kosten für Diagnose, Therapie, Rehabilitation und den Einkommensverlusten der Patienten zu den teuersten Krankheiten. Berechnungen des National Health Interview Survey gehen von jährlichen Kosten in Höhe von 8,74 Mrd. US Dollar bzw. 0,3% des Bruttoinlandproduktes aus.

Pathophysiologisch beobachtet man bei Patienten mit rheumatoider Arthritis eine Trias aus synovialer Hyperplasie, chronischer Entzündung und abnormaler humoraler und zellulärer Immunreaktion. Dies manifestiert sich in einem hypertrophischen und ödematösen Synovium mit einer proliferierenden

Einleitung

Grenzzellschicht und der typischen Pannusbildung (gefäßreiches, entzündlich-reaktives Granulationsgewebe (Abbildung 1)). Zusätzlich wird im Gelenk vermehrt Synovialflüssigkeit mit verminderter Viskosität gebildet, welche v.a. Neutrophile und Makrophagen enthält.

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines gesunden Gelenksitus und eines Gelenks mit hyperplastischem Synovium mit Pannusbildung und Gelenkdestruktion



Durch diese Vorgänge entsteht die bei Rheumapatienten typische Schwellung der Gelenke und die knotenartige Struktur. Dies führt zu Bewegungseinschränkungen, die bis hin zu einer völligen Versteifung des Gelenks reichen können.

Die Arthrose, deren Bezeichnung Arthritis deformans von Virchow 1869 geprägt wurde, wird mit dem Begriff „Osteoarthritis“ (= Polyarthrose, OA) von der rheumatoiden Arthritis unterschieden. Die Genese der OA ist eher biomechanischer und sekundär entzündlicher Art mit einer ähnlichen Verteilung der betroffenen Gelenke sowie der Entzündungsmediatoren wie bei der RA, in allerdings geringerer Ausprägung. Daher werden Gewebe von Patienten mit OA in der Regel als Kontrollgruppe zum Vergleich zur RA herangezogen.

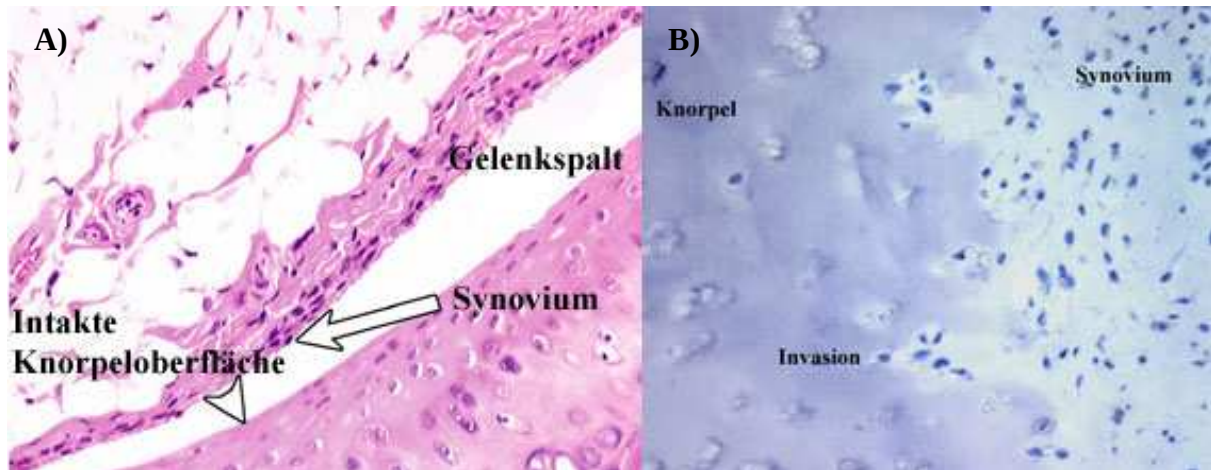
1.1.1. Synoviale Hyperplasie und Knorpeldestruktion

Eines der Hauptcharakteristika der RA ist die synoviale Hyperplasie. Diese ist durch eine Einwanderung von aus dem Knochenmark stammenden Monozyten aus dem

Einleitung

Blutkreislauf, sowie durch eine lokale Proliferation von synovialen Fibroblasten v.a. in der Deckzellschicht bereits im frühen Stadium der RA charakterisiert, die bei der RA bedeutend stärker als bei der OA ausgeprägt ist. Die Deckzellschicht des Synoviums, die an den Synovialspalt angrenzt, besteht in der RA auch aus wesentlich mehr Zellschichten als im normalen Gelenk (s. Abbildung 2).

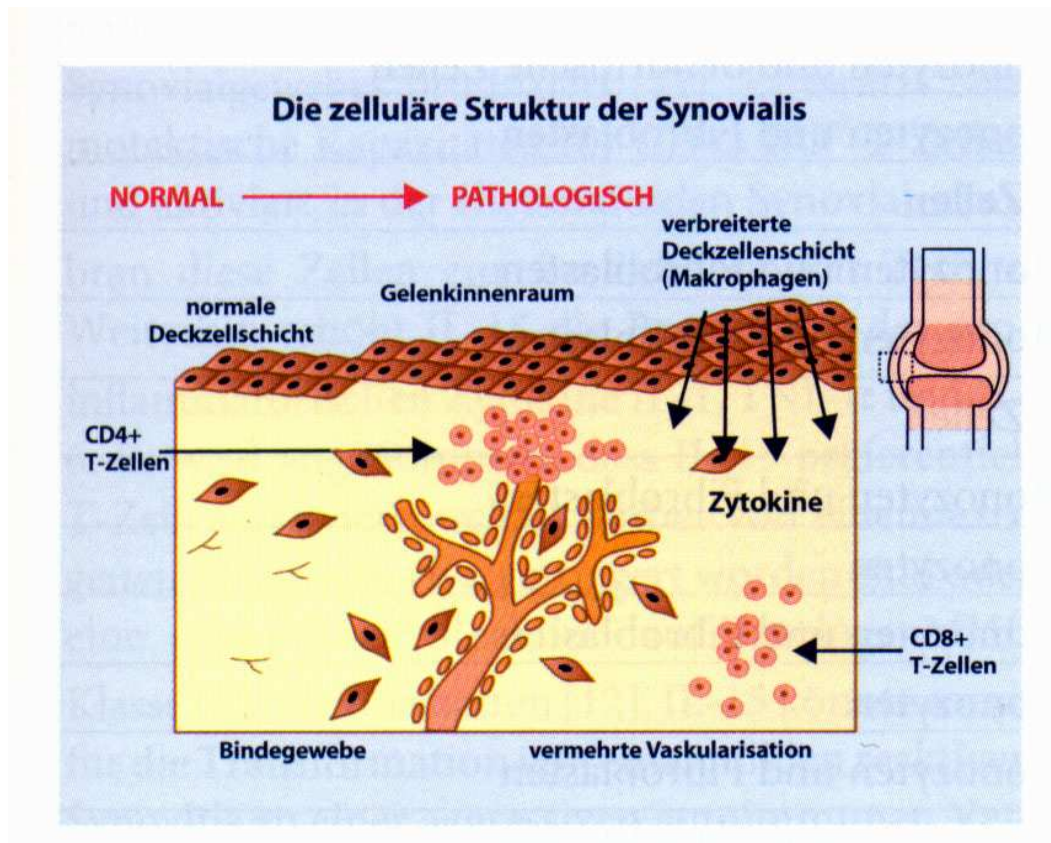
Abbildung 2: Normale Deckzellschicht (A), synoviale Hyperplasie der Deckzellschicht (B)



Die Pannusbildung und Knorpeldestruktion beginnt bei der RA zunächst mit einer Proliferation von Zellen der synovialen Deckzellschicht („lining“) und bedingt die Teilnahme aller im Synovium ortsständigen und aus dem Blutkreislauf eingewanderten Zellen. Das veränderte Synovium weist T-Zellen, Plasmazellen, B-Zellen, Fibroblasten, Makrophagen, Endothelzellen, Mastzellen, NK-Zellen und dendritische Zellen in den tieferen Schichten der Synovialmembran („sublining“) und Fibroblasten sowie Makrophagen in der Deckzellschicht („lining“) auf. Die Einwanderung von Zellen aus dem Blut wird v.a. durch eine erhöhte Vaskularisierung des Synoviums ermöglicht (Paleolog, 1996). Nach Anheftung der Zellen der Deckzellschicht an den Knorpel invadieren diese das Knorpelgewebe. Ein Pannus (lat. Lappen) entsteht, der am Knorpel anliegt und die darunter liegende Knorpelmatrix angreift (s. Abbildung 3). Ist der Knorpel destruiert, wird der Knochen ebenfalls angegriffen.

Einleitung

Abbildung 3: Rheumatoide Arthritis: Schema der progressiven Destruktion eines Gelenks



Besonders bemerkenswert bei diesem Prozeß ist, daß die Proliferation und Invasion dieser Zellen im Anfangsstadium durch die Abwesenheit von Entzündungszellen einschließlich der T-Lymphozyten gekennzeichnet sein kann. Sowohl Makrophagen als auch synoviale Fibroblasten der Deckzellschicht bei Patienten mit RA weisen einen aktivierten Phänotyp auf, der durch eine verlängerte Lebensdauer, evtl. bedingt durch eine verringerte Apoptose, sowie durch eine erhöhte Zytokinproduktion auffällt. Zusätzlich deuten ein erhöhter Glukosestoffwechsel, eine erhöhte Produktion von MMP (Matrix-Metalloproteinasen) und Adhäsionsmolekülen, eine gesteigerte Proliferation und eine erhöhte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen auf den aktivierten Phänotyp von synovialen RA-Fibroblasten hin .

A) Mediatoren der Gelenkdestruktion

Die progressive Gelenkdestruktion wird von Matrix-abbauenden Proteasen durch T-Zell-abhängige sowie T-Zell-unabhängige Stoffwechselwege vermittelt (Gay et al., 1993). Eine zentrale Rolle spielen hierbei Matrix-Metalloproteinasen (MMP), eine Familie, die inzwischen mehr als 10 Mitglieder umfaßt. Neben Fibroblasten und Makrophagen tragen Chondrozyten nach Stimulierung durch z.B. IL-1 selbst zur MMP-Synthese und -Freisetzung und somit zur Knorpeldestruktion bei.

Einleitung

B) Mediatoren der Anheftung von Synoviozyten an den Knorpel

Adhäsionsmoleküle sind vermutlich an der Anlagerung der synovialen Grenzzellschicht an den Knorpel und somit an der Pannusbildung beteiligt. V.a. Zellen an der Pannus-Knorpel-Grenze, insbesondere synoviale Fibroblasten, weisen unter anderem eine erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1, ICAM-1 und -3, Integrinen und CD44 auf.

C) Verstärkte Proliferation und Zellaktivierung in der synovialen Deckzellschicht

Synoviale Fibroblasten der Deckzellschicht von Patienten mit RA können über mehrere Passagen kultiviert werden. Diese Zellen weisen eine veränderte Expression bezüglich verschiedener Proto-Onkogene und Tumor-Suppressor-Gene, sowie von Genen, die in die Regulation des Zellzyklus eingreifen, auf.

In der RA sind Proto-Onkogene v.a. an der Zellaktivierung und -proliferation beteiligt. Der Begriff „Onkogen“, der aus der Onkologie stammt, bedeutet hierbei nicht Malignität, sondern dient als Marker erhöhter Proliferation und des metabolisch aktivierten Phänotyps transformierter synovialer Zellen. Proto-Onkogene, die wichtige Funktionen in der Entwicklungsbiologie steuern, können durch bestimmte Stimuli oder Mutationen pathophysiologisch relevant werden. Mehrere Proto-Onkogene, wie z.B. *ras*, *fos*, *jun*, *egr-1* und *myc* werden z.B. in knorpelnahen synovialen Fibroblasten vermehrt exprimiert.

Tumor-Suppressor-Gene werden ebenfalls bei der RA aktiviert. In Fibroblasten nachgewiesene Mutationen in Tumor-Suppressor-Genen wie *p53* könnten hierbei möglicherweise mit einer verstärkten Proliferation oder verlängerten Lebensdauer synovialer Fibroblasten einhergehen, was eine längere Expression von MMP an der Abbauzone von Knorpel und Knochen bewirken könnte. Auch die Tatsache, daß sehr wenige apoptotische Zellen im Synovium von Patienten mit RA nachgewiesen werden konnten, weist auf eine gestörte Apoptose und verlängerte Lebensdauer der Fibroblasten hin. Eine wichtige Rolle bei der Induktion der Apoptose von Fibroblasten kommt auch dem relativ neu identifizierten Tumor-Suppressor-Gen *p33 ING1* zu (Vieyra et al., 2002; Campos et al., 2004)). Für *p33 ING1* wurden *p53* abhängige und unabhängige antiproliferative Effekte nachgewiesen (Tsang et al., 2003).

Hinzu kommt die erhöhte Synthese verschiedener Wachstumsfaktoren, wie z.B. FGF, EGF, PDGF, IGF, GM-CSF und M-CSF, wobei jedoch keiner dieser Faktoren spezifisch für die RA ist.

Einleitung

1.1.2. Entzündung

Zytokine vermitteln die Kommunikation zwischen Zellen. Die Einteilung der Zytokine erfolgt hinsichtlich ihrer Hauptaufgabe, wobei jedes Zytokin jedoch in mehr als einer dieser Kategorien wirksam sein kann: Wachstum, Differenzierung, Immunregulation, Entzündungsvermittlung und -hemmung, Hämatopoese und Chemotaxis. Im RA Synovium sind v.a. synoviale Fibroblasten, Makrophagen aber auch T-Zellen an der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen beteiligt. Von dieser Vielzahl an Zytokinen werden IL-1 α , -1 β , -6, -17 und TNF α als die wichtigsten proinflammatorischen Zytokine in der RA angesehen und als Ansatzpunkt für neue Therapiestrategien in Betracht gezogen, bzw. sind bereits im klinischen Einsatz (van den Berg et al., 2009; Gaffen, 2009; Fujimoto et al., 2008) . Hierbei stehen Agenzien im Mittelpunkt, welche die Sekretion dieser Zytokine, bzw. ihre Bindungskapazität an Zelloberflächen-Rezeptoren inhibieren. Mittels Zytokin-spezifischer Antikörper (Ak), löslicher Rezeptoren und Rezeptor-Antagonisten wird versucht, die inflammatorische Wirkung dieser Schlüsselzytokine des entzündlichen Prozesses zu unterdrücken. Die Zytokine in der rheumatoiden Synovialmembran bilden ein Netzwerk überlappender, synergistischer, antagonistischer und inhibitorischer Aktivitäten, charakterisiert durch eine erhöhte Produktion entzündlich wirkender Zytokine. IL-1, IL-6 und TNF α stehen derzeit im Mittelpunkt aktueller Untersuchungen und klinischer Studien, wobei TNF α -Hemmer, Interleukin-1-Rezeptor-Antagonisten und Interleukin-6-Rezeptor-Antagonisten bereits als Medikamente eingesetzt werden. Da jedes dieser Zytokine neben proinflammatorischen Eigenschaften auch andere Funktionen wahrnehmen kann, müssen jedoch die Wirkungen und Nebenwirkungen der antiinflammatorischen Therapie genau untersucht werden. So stimuliert z.B. IL-1 Chondrozyten zur Freisetzung von degradierenden Enzymen (Dingle, 1979). Daher ist es von Bedeutung, molekulare Wirkungsmechanismen dieser Zytokine aufzuklären und zu analysieren, in welche Stoffwechselwege bei einer Zytokinhemmung eingegriffen wird. Nicht nur eine entzündungshemmende oder knorpelprotektive Wirkung könnte erzielt werden, möglicherweise würden auch unerwünschte Reaktionen im Gelenk und im Gesamtorganismus durch eine solche Zytokinhemmung bewirkt.

Einleitung

1.2. Klassifizierung der rheumatoiden Arthritis

Die derzeit geltenden Kriterien zur Klassifizierung der RA basieren auf der 1987 aufgestellten Einteilung des „American College of Rheumatology“ (ACR). Die Sensitivität dieser Kriterien beträgt 91 bis 94 %, die Spezifität 89%. Obwohl diese Kriterien für epidemiologische Zwecke entwickelt wurden, stellen sie nützliche Richtlinien zur Diagnosestellung dar. In frühen Krankheitsstadien können jedoch die erforderlichen Kriterien noch fehlen. Anhand der Kriterien lässt sich auch nicht zwischen mildem und schwerem Verlauf der Erkrankung differenzieren.

Für die Diagnose müssen 4 der 7 in Tabelle aufgelisteten Kriterien erfüllt sein, wobei die Kriterien 1-4 für mindestens 6 Wochen Bestand haben müssen.

Tabelle 1: Diagnosekriterien der RA.

1.	Morgensteifigkeit: Die Steifigkeit der Gelenke dauert mindestens 1 Stunde bis zur maximalen Besserung.
2.	Arthritis an 3 oder mehr Gelenkregionen: Mindestens drei Gelenkregionen zeigen gleichzeitig von einem Arzt festgestellte Weichteilschwellungen oder Gelenkergüsse, nicht nur knöcherne Auswüchse. Die 14 möglichen beteiligten Gelenkregionen sind rechte oder linke proximale Interphalangeal-, Metacarpophalangeal-, Hand-, Ellbogen-, Knie, Fuß- und Metatarsophalangealgelenke.
3.	Arthritis der Handgelenke: Arthritis des Handgelenks, der Metacarpophalangealgelenke oder proximalen Interphalangealgelenke.
4.	Symmetrische Arthritis: Gleichzeitige Beteiligung der gleichen Gelenkregionen an beiden Seiten des Körpers.
5.	Rheumaknoten: Von einem Arzt nachgewiesene subkutane Knoten über knöchernen prominenten Stellen, Extensorflächen oder im gelenknahen Bereich.
6.	Rheumafaktor im Serum: Nachweis pathologischer Konzentrationen des Rheumafaktors im Serum durch jede Methode, bei der das Ergebnis bei < 5% der gesunden Kontrollpersonen positiv ausfällt.
7.	Radiologische Veränderungen: Für eine RA typische Veränderungen in posterior-anterioren Aufnahmen der Hände und Handgelenke, die Erosionen oder gelenknah eine eindeutig verminderte Knochendichte beinhalten.

Einleitung

Mittlerweile wird in der klinischen Praxis zunehmend der Antikörper gegen zyklisch citrullinierte Antikörper (anti-CCP-Ak) bestimmt, da diese eine höhere Spezifität und Sensitivität als der Rheumafaktor aufweisen, speziell in der frühen Phase der Erkrankung. Die Modifikation der ACR-Kriterien durch den Austausch von „Rheumaknoten“ gegen „anti-CCP-Antikörper“ führt zu einer höheren Sensitivität ohne Einbußen bei der Spezifität der Diagnoskriterien (Zhao et al., 2009). Auch die Bestimmung von Antikörpern gegen mutiertes citrulliniertes Vimentin scheint vielversprechend. Ein ELISA auf der Basis von mutiertem citrulliniertem Vimentin (MCV) steht seit einiger Zeit für die Diagnostik der rheumatoiden Arthritis kommerziell zur Verfügung und bietet eine vergleichbare diagnostische Sensitivität und Spezifität wie die Anti-CCP-Antikörper (Egerer et al. 2009)

Außerdem kommt zur quantitativen Beurteilung des Krankheitszustandes und des Krankheitsfortschritts zunehmend der Disease Activity Score 28 (DAS28) in der klinischen Forschung und auch in der Patientenversorgung zum Einsatz.

Die DAS28-Werte bewegen sich in der Regel zwischen 2,0 und 9,0. Höhere Werte entsprechen einer höheren Krankheitsaktivität. Ein DAS28 unter 2,6 wird als Remission gewertet.

„28“ bezieht sich auf die Anzahl der untersuchten Gelenke (Finger- [Metacarpophalangeal- und proximale Interphalangealgelenke], Hand-, Ellenbogen-, Schulter- und Kniegelenke).

Folgende Parameter fließen in den DAS28 ein:

- Anzahl der druckschmerzhaften Gelenke (0-28)
- Anzahl der geschwollenen Gelenke (0-28)
- Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (mm/h)
- Einschätzungen des Krankheitszustandes/Aktivität der Krankheit durch den Patienten (0-100 mm Visuelle Analog Skala)

Der DAS28 wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{DAS28} = 0,56 \cdot \sqrt{\text{druckschmerzhafte Gelenke}} + 0,28 \cdot \sqrt{\text{geschwollene Gelenke}} + 0,70 \cdot \ln(\text{BSG}) + 0,014 \cdot \text{Krankheitszustand}$$

Einleitung

1.3. Theorien zur Pathogenese der rheumatoiden Arthritis

Da die Veränderungen bei rheumatoider Arthritis durch Entzündung und abnormale humorale und zelluläre Immunreaktion, sowie durch synoviale Hyperplasie beschrieben werden können, entstanden im Laufe der Erforschung der RA entsprechende Theorien zur Entstehung.

Immunkomplexmodell:

Zunächst entstand die Hypothese der Antigen-Antikörper-Reaktion als zentralem Mechanismus, wobei die Gelenkdestruktion mit persistierender Entzündung durch Autoantikörper gegen spezifische Antigene vermittelt wird. Dies basiert auf der Beobachtung abnormaler humoraler Immunreaktionen mit gesteigerter Produktion von Autoantikörpern, wie Rheumafaktoren und Ak gegen Knorpelkollagen Typ II (Zvaifler, 1996). Es wurde jedoch ersichtlich, daß die Pathogenese der RA weitaus komplexer ist. Vermutlich ist diese Autoimmunreaktion sekundär durch Knorpel- und Knochenabbau-Prozesse bedingt. Durch den Abbau werden verschiedene Autoantigene in hohem Maße freigesetzt, wodurch es über APZ zur Autoantigen-Präsentierung kommen könnte. Autoimmunität könnte somit eine Rolle in der Chronifizierung und Progression der RA spielen. Die Theorie, daß Autoantikörper alleinig ausschlaggebend für die Initiierung der RA sind, wird inzwischen nicht mehr favorisiert, wobei „RA-spezifische“ Autoantikörper wie solche gegen citrullierte Peptide mehr als 10 Jahre vor Beginn der RA im Serum nachgewiesen werden können (Klareskog et al., 2009)

T-Zell abhängige Mechanismen als Ursache der RA:

Diese Hypothese basiert auf primär T-Zell- und nicht antigenabhängigen Mechanismen. Eine signifikante Häufung eines „shared epitope“, einer Aminosäuresequenz in der β -Kette des HLA-DR4- und -DR1-Komplexes auf APZ des RA-Synoviums und das signifikant häufigere Auftreten von HLA-DRB1*0401 in Patienten mit aggressivem klinischen Verlauf, sprechen für die Beteiligung von T-Zellen an der Genese der RA, wobei diese Häufung jedoch nur für Patienten kaukasischen Ursprungs gilt. Hierbei würde mittels oben beschriebener Moleküle ein bisher unbekanntes Antigen $CD4^+$ T-Helferzellen präsentiert. Diese Theorie wurde durch die große Anzahl von v.a. $CD4^+$ T-Zellen im entzündlich veränderten Synovium gestärkt. Seither wird nach RA-spezifischen T-Zell-Klonen gesucht, die bis heute jedoch nicht identifiziert werden konnten. Die genaue Beteiligung dieser T-Zell-

Einleitung

abhängigen zellulären Immunreaktionen in der Pathogenese der RA ist bisher noch ungeklärt.

Aktivierte Fibroblasten als Ursache der RA:

Diese Theorie basiert auf der Beobachtung, daß die aggressive gelenkdestruierende Deckzellschicht weitgehend T-Zell-frei ist. Zusätzlich gibt es vermehrt Hinweise, daß transformiert erscheinende synoviale Fibroblasten, die an der Invasionszone des Synovialgewebes in den benachbarten Gelenkknorpel und -knochen zu finden sind, entscheidend an der Zerstörung des Gelenks beteiligt sind. Diese Theorie wird durch die ausgeprägte Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen durch Fibroblasten im RA-Synovium, ein verändertes Wachstumsverhalten in vitro und die Fähigkeit an die Knorpelmatrix zu binden und diese aktiv zu zerstören, gestärkt. Weiterhin konnte mittels des SCID-Maus-Modells der RA gezeigt werden, daß isolierte synoviale RA-Fibroblasten nicht nur über eine lange Zeitspanne den Knorpel invadieren und zerstören, sondern auch die Erkrankung von Gelenk zu Gelenk tragen können (Lefeuvre et al., 2009). Synoviale Fibroblasten sind außerdem in der Lage, Osteoklasten zu stimulieren und weisen einen Schutz vor programmiertem Zelltod (Apoptose) auf, wodurch sie ihr invasives Verhalten dauerhaft fortsetzen können.

Stellt man die beiden letzten Theorien in Zusammenhang, könnte folgender Ablauf der Erkrankung postuliert werden:

Durch bisher unbekannte Stimuli, evtl. mit genetischer Prädisposition, kommt es zu einer Aktivierung des Synoviums einschließlich gefäßpermeabilisierender Veränderungen. Von synovialen Makrophagen und Fibroblasten produzierte Zytokine führen zu einer ersten entzündlichen Reaktion, welche nachfolgend zu einer Anreicherung von proinflammatorischen Zellen, v.a. T-Zellen, führt. Durch Degradationsprozesse des Knorpels und Zelltod kommt es verstärkt zur Präsentation von Antigenen mittels APZ und somit zur Aktivierung und klonalen Expansion von T-Zellen, wobei hier MHC Klasse II Moleküle eine besondere Rolle spielen könnten. So könnte ein Milieu entstehen, in dem inhibitorische Mechanismen (z.B. antiinflammatorische Zytokine) nicht mehr dem Entzündungsprozeß entgegenwirken können. Dies führt zu einem irreversiblen Prozeß, der sowohl T-Zell-dominiert mit akuten, entzündlichen Verläufen oder Schüben, als auch Deckzellschicht-dominiert mit fortschreitender Gelenkdestruktion mit nur mäßiger Entzündung verlaufen kann.

Einleitung

Letztlich kommt es zu einer entzündungsunabhängigen Progression der Gelenkdestruktion durch das invasiv wachsende Synovialgewebe.

Die molekularen Ursachen, welche in die morphologischen und physiologischen Veränderungen der jeweiligen Zellpopulationen involviert sein können, sind bisher nicht bekannt. Es wird vermutet, daß die Ursachen, die zur RA führen, sowohl eine genetische Prädisposition, z.B. mittels MHC-Restriktion, als auch umweltbedingte Ursachen, wie z.B. infektiöse Manifestationen, beinhalten können. Aus diesen Gründen wird von der RA heutzutage als einer typischen multifaktoriellen Erkrankung gesprochen.

1.4. Therapeutische Ansätze

Trotz Verbesserungen in der Behandlung der RA, v.a. durch Einsatz von Methotrexat (MTX) allein oder in Kombination mit anderen Basistherapeutika, vor allem der biologischen Wirkstoffe, besteht eine dringende Notwendigkeit für die betroffenen Patienten, neue Wege in Diagnostik und Therapie dieser Erkrankung zu finden, um möglichst früh bei Krankheitsbeginn differentialdiagnostisch und –therapeutisch die bestmögliche Hilfe zu erhalten.

Zurzeit werden weitere neue Versuchsansätze diesbezüglich untersucht. So werden Mechanismen im Bereich der Adhäsion, Transformation sowie Aktivatoren der Destruktion und Entzündungsmediatoren für gentherapeutische Zwecke untersucht, wie z.B.:

Adhäsionsmoleküle:	VCAM-1, ICAM, CS-1, Osteopontin
Chemokine:	SDF-1, MCP-1
Aktivierung:	PTEN, p53, p33ING1, Proto-Onkogene
Entzündung:	IL-1, IL-6, IL-15, IL-17, IL 12/23
Destruktion:	IL-1, IL-10, MMPs, TIMP, Kathepsine

Von besonderem Interesse für diese Arbeit waren p33ING1 und IL-6

p33ING1:

p33ING1 ist ein relativ neu isoliertes Tumor-Supressor-Gen (Garkavtsev et al., 1996). Das Protein p33ING1 konnte im Zellkern nachgewiesen werden und ist auf Chromosom 13q34 lokalisiert (Garkavtsev et al., 1997a; Zeremski et al., 1997). Es spielt eine Rolle bei der Apoptoseinduktion. So konnte in „älteren“ Zellen eine höhere Konzentration von p33ING1-RNA und -Protein nachgewiesen werden und die antisense-p33ING1-RNA-Expression führte zu einer deutlich verlängerten

Einleitung

Lebens- und Proliferationszeit von normalen menschlichen Fibroblasten (normal human fibroblasts NHF) (Garkavtsev et al., 1997b). Hierbei wurde auch ein enger Zusammenhang mit dem Tumorsuppressor p53 gefunden (Turovets et al., 2000; Vieyra et al., 2002). Aber auch in der Abwesenheit von p53 konnte ein antiproliferativer Effekt nachgewiesen werden, so dass von p53-abhängigen und -unabhängigen Mechanismen in der Zellproliferationsregulation von p33ING1 ausgegangen werden muss (Kataoka et al., 2003; Tsang et al., 2003). Über diese Mechanismen beeinflusst p33ING1 das Zellwachstum, DNA-Reparaturen, Transkriptions-regulation, Apoptose und Streßsignalmechanismen, abhängig vom Zellalter und den vorliegenden DNA-Schäden (Gong et al., 2006; Goeman et al., 2005; Campos et al., 2004). Da eine gestörte Apoptose auch bei synovialen RA-Zellen nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage inwieweit hier auch p33ING1 eine Rolle spielt.

IL-6:

IL-6 ist ein Zytokin das in verschiedensten Zellen produziert wird (Monozyten, Makrophagen und Nicht-Immunzellen, z.B. Endothelzellen und Fibroblasten) und je nach Zielzelle zu unterschiedlichen Effekten führt. So spielt IL-6 eine Rolle bei der Induktion von Akute-Phase-Proteinproduktion, T- und B- Zelldifferenzierung und Wachstum, der Auslösung von Immunantworten, Myelomzellwachstum und Osteoklastenwachstum und Osteoklastenaktivierung. 1986 wurde cDNA kloniert. Aufgrund der multiplen Funktionen wurde es simultan als BSF-2 (B-cell stimulatory factor), interferon-beta2 und 26 kDa-Protein in Fibroblasten bezeichnet, bis sich herausstellte, dass es sich um dasselbe Molekül handelt. Etwas später wurden noch Übereinstimmungen mit einem Plasmazytom-Wachstumsfaktor und einem Hepatozytenstimulationsfaktor gefunden. Aufgrund der breiten biologischen Aktivität waren verschiedene Namen für dieses Molekül im Umlauf, bis es als IL-6 vereinheitlicht wurde. Im Rahmen der rheumatoiden Arthritis wird in der Überproduktion von IL-6 ein wesentlicher Faktor für die Entzündungsreaktion und die Knochen- und Knorpelschäden gesehen. Dieser Ansatz führte 2009 auch zur Zulassung des IL-6-Hemmers Tocilizumab.

Weder durch Hemmung noch durch Überexpression eines dieser Zytokine allein, konnte jedoch bisher die fortschreitende Entzündung und Knorpeldestruktion bei der RA vollständig zum Stillstand gebracht werden. Daher sind Kombinationstherapien weiterhin von großem Interesse.

Einleitung

Keiner der Versuchsansätze mittels Überexpression protektiver Zytokine oder Hemmung destruktiver Moleküle konnte jedoch sowohl die Entzündung als auch die Gelenkdestruktion in verschiedenen Tiermodellen oder *in vitro* Experimenten komplett verhindern. Daher sind weitere Versuche in diese Richtung notwendig. Zwar stehen mehrere neue Substanzen und Moleküle zur Hemmung von gelenkdestruktiven Stoffwechselwegen zur Verfügung, diese können oft jedoch nicht eingesetzt werden, da keine geeigneten Verfahren existieren, um sie am Ort der Entzündung, der Invasionszone des aggressiven Synovialgewebes, in den Knorpel und Knochen direkt zu applizieren. Labile, rasch abgebaute Proteine müßten regelmäßig appliziert werden, was ein hohes Infektionsrisiko birgt. Durch raschen Lymphabtransport aus dem Gelenk wären zudem hohe Dosen notwendig. Eine Möglichkeit, diese Probleme zu umgehen, wäre die lokale Produktion solcher Moleküle durch körpereigene Zellen. Dies könnte erreicht werden, indem das Gen in synoviale Zielzellen mittels eines Vektors eingebracht und so in körpereigenen Zellen überexprimiert würde. Voraussetzung für eine Anwendung beim Menschen ist daher die Prüfung eines solchen Gentransfers an geeigneten Modellen.

II. FRAGESTELLUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war die genetische Veränderung von Fibroblasten mittels Lipotransfektion im Hinblick auf potentielle gentherapeutische Ansätze. Bezüglich der zu untersuchenden Moleküle konzentrierte sich die Arbeit zum einen auf das proinflammatorische Zytokin IL-6, das als ein wesentlicher Faktor für die Entzündungsreaktion und Gelenkschäden bei der RA angesehen wird und dies bereits in der klinischen Praxis bestätigt hat, da der IL-6-Hemmer Tocilizumab zu einer Reduktion der Entzündungsaktivität und Verlangsamung des Krankheitsfortschritts führen kann. (Choy 2004) Zum anderen wurde das Tumor-Suppressor-Gen p33ING1 gewählt, da es eine wichtige Rolle in der Apoptoseinduktion spielt und auch bei synovialen RA-Zellen eine gestörte Apoptose nachgewiesen werden konnte. (Firestein et al., 1996)

Ziel war es durch die Transfektion von RNA-Sonden oder Plasmiden die Produktion der Ziel-Proteine IL-6 und p33ING1 in den Fibroblasten zu hemmen und die Auswirkung auf die Eigenschaften der Fibroblasten mittels geeigneter Methoden nachzuweisen.

Damit ergaben sich folgende Problemstellungen:

1. Entwicklung von Plasmiden, die bei der Transkription entweder sense- oder antisense-mRNA von IL-6 oder p33ING1 produzieren.
2. Entwicklung von RNA-Sonden zur Transfektion
3. Etablierung eines Gentransfers mittels Lipofektion in Fibroblasten, der ausreichende Transfektionsraten erreicht, um Veränderungen der Genexpression nachzuweisen.
4. Nachweis der Transfektionsrate mittels geeigneter Methoden
5. Analyse der molekularen Veränderungen der IL-6 bzw. p33ING1 Produktion in den transfizierten Fibroblasten.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1. Chemikalien und Materialien

Stoffbezeichnung	Bezugsquelle
AFLc-HSA	DKFZ, Heidelberg
$\alpha^{32}\text{P}$ -dATP	Amersham Pharmacia, Freiburg
$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP	Amersham Pharmacia, Freiburg
Acrylamid-Bis-Fertiglösung (19:1)	Appligene, Illkirch, F
Acrylase	Stratagene, Amsterdam, NL
Agarose	FMC Bioproducts, Rockland, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Deisenhofen
Amphotericin B	Bristol-Myers Squibb, München
Ampicillin-trihydrat	Sigma, Deisenhofen
AmpliTa [®] DNA Polymerase	Perkin Elmer, Weiterstadt
AMV Reverse Transcriptase	Promega, Mannheim
Bacto-Agar	Difco, Detroit, USA
β -Mercaptoethanol	Amresco, Salon, USA
BioMax [™] ML Röntgenfilm	Kodak, Rochester, USA
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
BSA	Sigma, Deisenhofen
Chamber Slides, w/Cover RS Glass Slide	Nunc, Wiesbaden
Ciprofloxacin	Bayer, Leverkusen
DEPC	Sigma, Deisenhofen
Digoxigenin-UTP	Boehringer, Mannheim
Discarit [™] II 2ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Dispase II	Boehringer, Mannheim
DMEM (1 g/l Glukose) Grundmedium	Biochrom KG, Berlin
DMF	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Sigma, Deisenhofen

Material und Methoden

DNase I	Boehringer, Mannheim
DTT	Sigma, Deisenhofen
EDTA	Bio-Rad, Hercules, USA
Einfrierröhrchen (2 ml)	Corning Costar, Bodenheim
Eosin	Roth, Karlsruhe
FCS	PAA, Linz, A
Fluorescent Mounting Medium	Dako, Hamburg
Formalin, 4,5 %ig	Roth, Karlsruhe
Formamid	Sigma, Deisenhofen
Formaldehyd, 25 %	Sigma, Deisenhofen
Glutaraldehyd, 25 %	Sigma, Deisenhofen
Glyzerin	Sigma, Deisenhofen
Hämatoxylin	Roth, Karlsruhe
HEPES	Sigma, Deisenhofen
Hexadimethrin Bromid (Polybrene)	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol	Sigma, Deisenhofen
Isotone NaCl-Lösung, 0,9 % Braun	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
6-, 12-, 24-, 48-, 96-Loch Platten	Corning Costar, Bodenheim
Luria Broth	Sigma, Deisenhofen
Magermilchpulver	Domspitz, Regensburg
Micro-Fine 12,7mm	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
MicroAmp [®] Reaction Tubes, 8/12 tubes/stripe	PE Applied Biosystems, Foster City, USA
Microlane [®] 3 sterile Nadeln	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim
MspI-pBR 322-Verdau	New England Biolabs, Schwalbach
Natriumpyruvat	Biochrom KG, Berlin
Neu Fuchsin Färbelösung	Dako, Hamburg
OCT [™] Tissue-Tek [®]	DiaTec, Hallstadt
PBS	PAA, Linz, A
Penicillin/Streptomycin	PAA, Linz, A
Poly-L-Lysin	Sigma, Deisenhofen
RNase-Inhibitor	Roche Diagnostics, Mannheim
Seralon [®] blau Ds-12	Serag Wiessner, Naila

Material und Methoden

SSC, 20x	Sigma, Deisenhofen
SuperFrost® Plus Objektträger	Menzel Gläser, Braunschweig
TCPP-HSA	DKFZ, Heidelberg
Trypsin/EDTA	PAA, Linz, A
Whatman-Papier	Whatman, Biometra, Göttingen
X-Gal	Gibco, Karlsruhe
Zellkulturflaschen	Corning Costar, Bodenheim

Alle anderen Chemikalien und Materialien wurden von der Firma Merck Eurolab, Darmstadt in p.a.-Qualität bezogen. Die Restriktionsenzyme und die entsprechenden Puffer wurden von New England Biolabs, Schwalbach, bezogen.

1.2. Zellen und Organismen

Tabelle 2: Zellen

Zelllinie	Herkunft	Bezugsquelle
NHDF-c	normale Hautfibroblasten, human	PromoCell, Heidelberg

Tabelle 3: Organismen

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> TOP 10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 deoR recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7696 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen, Karlsruhe

1.3. Oligonukleotide

Tabelle 4: Arbiträre Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Verwendung
OPN 23	CAG GGG CAC C	RT der RAP-PCR
OPN 21	ACC AGG GGC A	RT und PCR der RAP-PCR
US6	GTG GTG ACA G	RAP-PCR
Random Hexamers	Mix	RT (Perkin Elmer, Weiterstadt)

Material und Methoden

Tabelle 5: Genspezifische Oligonukleotide

Primer	Sequenz (5' - 3')	T _{ann} MgCl ₂	Produkt- länge	Verwendung
18S-f 18S-r	TCA AGA ACG AAA GTC.GGA.G GGA CAT CTA AGG GCA TCA CA	54-59 3mM	488 Bp	Realtime-PCR, Quantum, RT- PCR
M13 for M13 rev	CGT TGT AAA ACG ACG GCC AG CAG GAA ACA GCT ATG ACC AT	55	243 Bp	Kontroll-PCR aus Plasmiden
IL-6 - for IL-6 - rev	CGG CAT CTC AGC CCT GAG AA CTT CGT CAG CAG GCT GGC AT	61,4	350 Bp	PCR, Plasmidherstellung, RT-PCR
p33ING – for p33ING - rev	GAA GAT CCA GAT CGT GAG CC GAC AGT ACG TGG GTT CGT TG	59,4	387 Bp	PCR, Plasmidherstellung, RT-PCR

Die genspezifischen Oligonukleotide wurden mit dem Programm „DNAsis 2.5“ (Hitachi Software Engineering Co.) entworfen und mittels BLAST Search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) auf ihre Spezifität überprüft und von MWG Biotech, Ebersberg in HPSF-Qualität (high purity salt free) bezogen. Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden in H₂O_{bidest.} gelöst (100 pmol/μl).

Die Sequenzen der Oligonukleotide für die RAP-PCR stammen aus dem Labor von M. McClelland, Sidney Kimmel Cancer Center, San Diego, USA. Die Sequenzen der 18S-Primer wurden dem QuantummRNATM Kit entnommen, die der M13-Primer dem TOPOTM TA Cloning[®] Kit.

Die in Tabelle aufgeführten Primer sind mit f, F, for bzw. For für vorwärts („forward“) und r, R, rev, bzw. Rev für rückwärts („reverse“) bezüglich der 5'-3'-Orientierung der DNA gekennzeichnet.

Material und Methoden

1.4. Vektoren und Plasmide

Tabelle 6: Vektoren

Vektor	Referenz
pCR [®] II–TOPO	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA3.1(+)	Invitrogen, Karlsruhe

Tabelle 7: Plasmide

Plasmid	Verwendung
pIL-6	<i>Transfektion, RNA-Sonden-Herstellung</i>
pp33ING1	<i>Transfektion, RNA-Sonden-Herstellung</i>

1.6. Antikörper

Tabelle 8: Primärantikörper

Spezifität	Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
p33ING1	Ziege anti Human, polyklonal	1:50	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA

Tabelle 9: Sekundärantikörper und Zubehör für Immunhistologie und *in situ* Hybridisierung

Sekundärantikörper/Zubehör	Bezugsquelle
<i>anti</i> -Digoxigenin-AP Ak	Boehringer Mannheim, Mannheim

1.7. Kits und Standards

Tabelle 10: Verwendete Kits

Kit	Bezugsquelle
1 st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)	Boehringer, Mannheim
Atlas [™] human Apoptosis Array	Clontech, Palo Alto, USA
Atlas [™] human Cytokine Array	Clontech, Palo Alto, USA
Atlas [™] human Oncogene/ Tumor-suppressor gene	Clontech, Palo Alto, USA
β-Gal staining Kit	Roche Diagnostics,
LightCycler–FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche Diagnostics,
MAXIsript [™]	Ambion, Wiesbaden
Peroxidase Substrate Kit AEC	Vector Laboratories,
QIAprep [®] Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick [™] Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick [™] PCR purification Kit	Qiagen, Hilden

Material und Methoden

Quantikine human IL-6 Colorimetric Sandwich ELISA	R&D Systems, Wiesbaden
QuantumRNA™ 18S Internal Standard	Ambion, Wiesbaden
RiboGreen™ RNA Quantitation Kit	Molecular Probes, Leiden,
RNase-free DNase Set	Qiagen, Hilden
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
Taq PCR Master Mix Kit	Qiagen, Hilden
TOPO™ TA Cloning®	Invitrogen, Karlsruhe

Tabelle 11: Standards

Standard	Verwendung	Hersteller
100 bp marker	Agarose- Gelelektrophorese	Gibco, Karlsruhe
500 bp marker	Agarose- Gelelektrophorese	Gibco, Karlsruhe
1 kb marker	Agarose- Gelelektrophorese	Gibco, Karlsruhe

1.8. Geräte

Tabelle 12: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Emax precision microplate reader; Software: Softmax	Molecular Devices, MWG, Ebersberg
LightCycler® 2.0 Instrument Software: LightCycler® Software 4.05	Roche Diagnostics, Mannheim
GeneAmp® PCR System 9700	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Jung Frigocut 2800E	Leica, Nussloch
RP X–OMAT Processor Model M6B	Eastman Kodak Company, Rochester,
Spectra Fluor Plus, Software: Magellan	Tecan, Crailsheim
Storm 860 Phosphorimager	Molecular Dynamics, Freiburg
Vertikale Gelelektrophorese kammer	Gibco, Karlsruhe
Mikroskopsystem Leitz DM RBE, Software: Metaview	Leica, Heidelberg

Material und Methoden

2. Methoden

2.1. Zellbiologische Methoden

2.1.1. Isolierung der Fibroblasten

Die verwendeten Fibroblasten wurden von Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA) oder Osteoarthritis (OA) gewonnen, die sich an der Klinik und Poliklinik für Orthopädie der Universität Regensburg einer Synovektomie oder einem Gelenkersatz unterzogen. Die synovialen Gewebeproben wurden hierfür unter der Sterilbank mechanisch zerkleinert und 2 Stunden bei 37°C mit Dispase-Lösung verdaut. Die so gewonnen Zellen wurden steril filtriert und in Zellkulturflaschen angezüchtet.

2.1.2. Zellkultivierung

Die Fibroblasten wurden in DMEM Medium (500 ml) mit 10% fetalen Kälberserum (50 ml), 1% Penicillin/Streptomycin (5ml), Amphotericin B (0,5 ml) und 1M Hepes (5 ml) als Zusätzen im Brutschrank bei 37°C, 10% CO₂ Gehalt und 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das Medium wurde zweimal pro Woche durch frisches auf 37°C erwärmtes Medium ersetzt. Wenn der Zellrasen 70-80% konfluent war, wurden die Fibroblasten folgendermaßen gesplittet: Das Medium wurde aus den Zellkulturflaschen abgesaugt und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Dann wurden die Fibroblasten mit 5 ml Trypsin überschichtet und 10 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die dann abgelösten Zellen wurden mit 5 ml Medium versetzt, in Falcon Tubes pipettiert und 10 min bei 1200 U/min zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in frischem DMEM Medium resuspendiert und je nach Verwendungszweck auf Zellkulturflaschen oder 6-Wells verteilt, die schon die entsprechende Menge an frischem Medium enthielten.

Material und Methoden

2.2. Herstellung der Plasmide für die Transfektion

2.2.1. Primerkonstruktion

Um von p33ING1 und IL-6 PCR-Produkte herzustellen wurden die entsprechenden Primer mit dem Computerprogramm DNAsis konstruiert und für die PCR optimiert. Das gewünschte PCR-Produkt sollte zwischen 300 und 500 Basen lang sein und nicht ganz am Anfang oder Ende des gewünschten Gens liegen. Die Primerlänge wurde auf 20 Basen festgesetzt. Die Primer wurden nach folgenden Kriterien ausgewählt: C/G-Basengehalt 40-60%; ungefähr gleicher Schmelzpunkt für forward und reverse Primer; Primer sollten nicht mehr als 3 gleiche Basen hintereinander enthalten und außerdem bei der Primerprüfung keine Hairspins bilden und sich nicht an sich selbst oder den gegenläufigen Primer anlagern.

Nach diesen Kriterien wurden folgende Primer konstruiert:

IL-6 forward 220:

5'-CGG CAT CTC AGC CCT GAG AA-3'

Schmelzpunkt: 61,4°C

IL-6 reverse 570:

5'-CTT CGT CAG CAG GCT GGC AT-3'

Schmelzpunkt: 61,4°C

p33ING1 forward 319:

5'-GAA GAT CCA GAT CGT GAG CC-3'

Schmelzpunkt: 59,4°C

p33ING1 reverse 700:

5'-GAC AGT ACG TGG GTT CGT TG-3'

Schmelzpunkt: 59,4°C

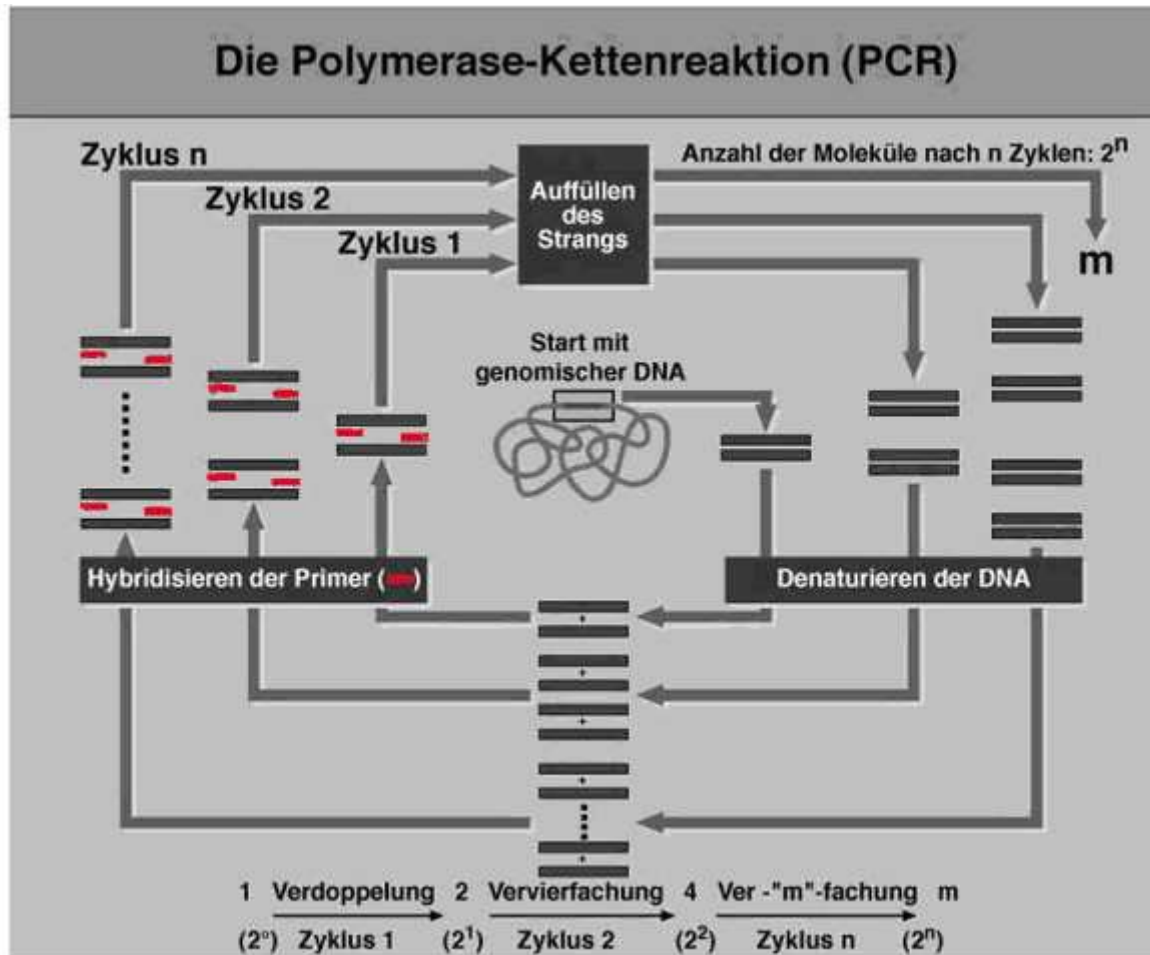
2.2.2. PCR

Seit 1985 stellt die Polymerase-Kettenreaktion ein geeignetes Verfahren dar, um bestimmte Abschnitte der genomischen DNA zu vervielfältigen (Schutzbank 1993). Nach Denaturierung der DNA in Einzelstränge können sich die gewählten Primer an den gewünschten Abschnitt anlagern und der Einzelstrang wird durch die Polymerase wieder zum Doppelstrang ergänzt. Durch mehrere Zyklen erhält man

Material und Methoden

schließlich eine große Anzahl gleicher DNA-Abschnitte. Aus einem DNA-Molekül können in wenigen Stunden 100 Billionen Kopien gewonnen werden (Templeton 1992) (Abbildung 4)

Abbildung 4: Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion



Für die PCR wurde folgender Ansatz gewählt:

Tabelle 13:

Menge	Reagenzien
5 µl	cDNA
10 µl	Supermix Quiagen mit Taq Polymerase
1 µl	Primermix (reverse+forward 1:10 verdünnt)
4 µl	Dest. Wasser

Hierbei wurde für die p33ING1-PCR cDNA von Normalhautfibroblasten mit dem p33ING1 Primermix und für die IL-6-PCR cDNA von synovialen Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA) mit dem IL-6 Primermix verwendet.

Material und Methoden

Die PCR durchlief im Thermocycler folgende Schritte in 35 Zyklen:

Denaturierung bei 94°C für 2 min.

Annealing bei 53°C für 3 min.

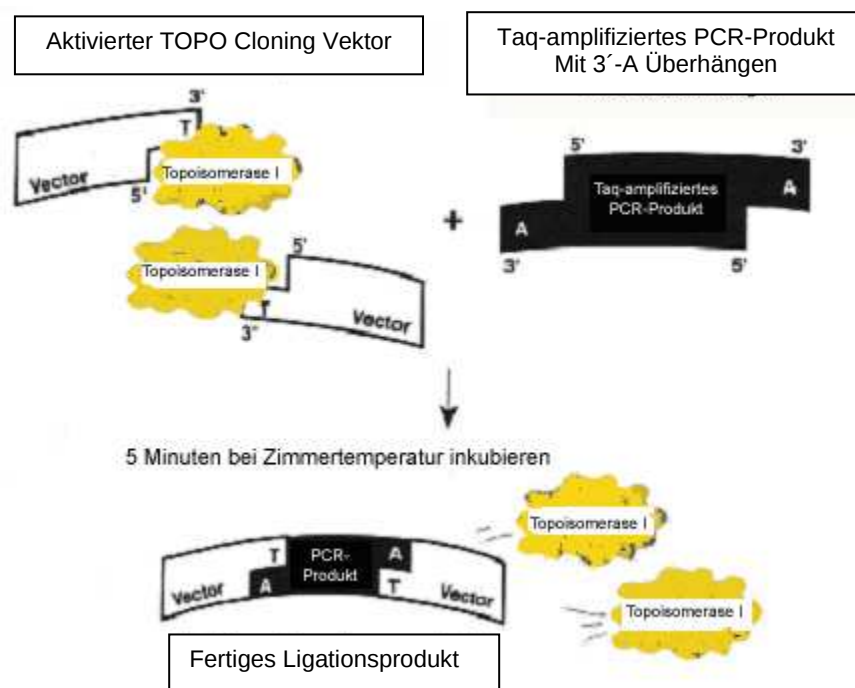
Extension bei 72°C für 2 min.

Zum Nachweis der Vervielfältigung des gewünschten Basenpaarabschnittes wurde 1µl Reaktionsansatz auf 2% Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.3. Ligation und Klonierung

Ligation und Klonierung wurden mit TOPO TA Cloning Kit durchgeführt. Das Taq Polymerase amplifizierte PCR-Produkt wird bei dieser Technik direkt in den aktivierten Plasmid Vektor integriert, da die Taq Polymerase an die 3'-Enden des PCR-Produkts ein einzelnes Desoxyadenosin anhängt und der linearisierte Vektor einzelne überstehende 3'-Desoxythymidin-Enden, als Ligationspartner für das Desoxyadenosin, besitzt. Aktiviert wird der Vektor dann durch die an die freien Enden gebundene Topoisomerase I (Shuman 1994).

Abbildung 5: Prinzip der Ligation



Material und Methoden

Für die Ligation wurde folgender Ansatz gewählt:

Tabelle 14:

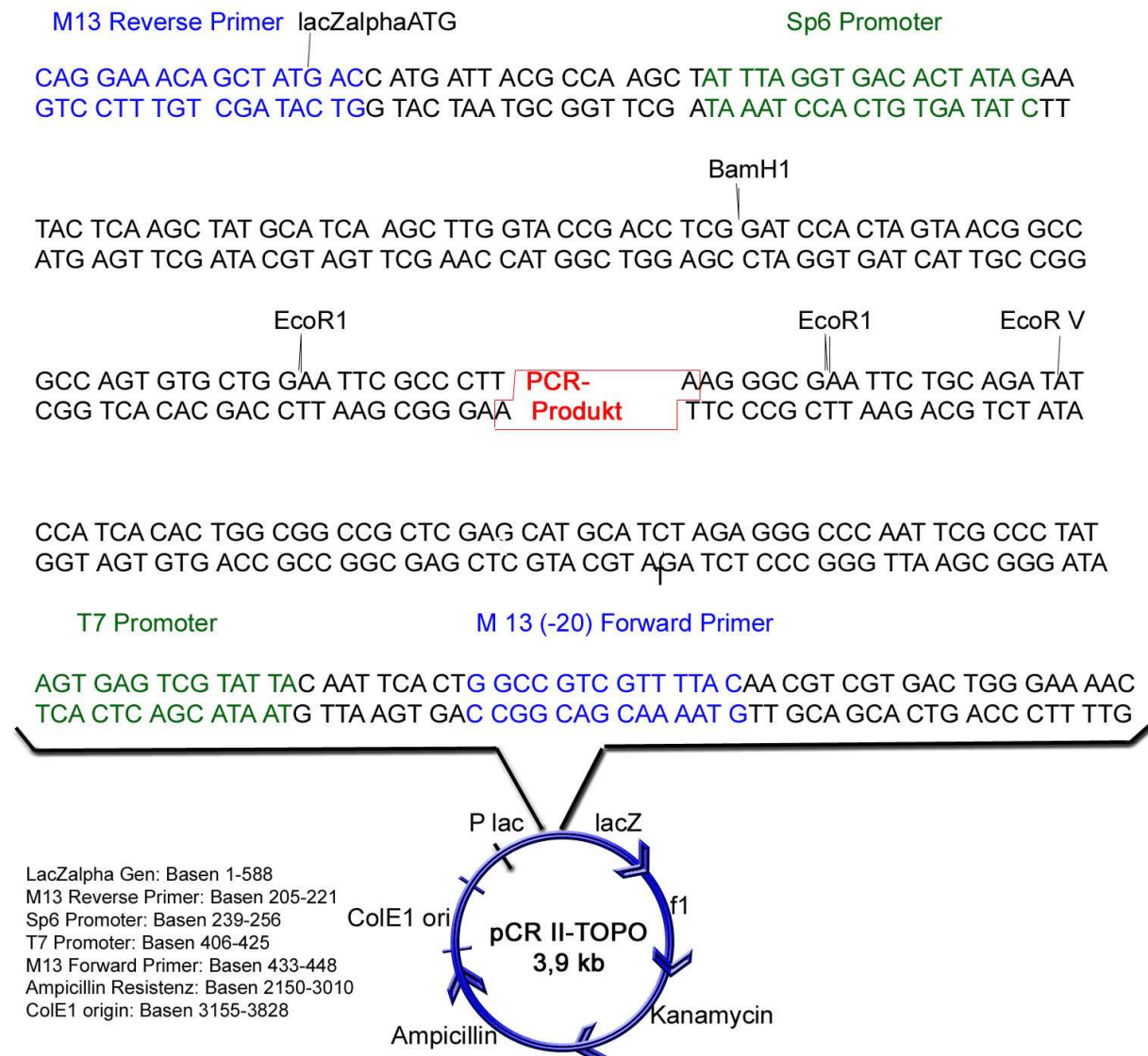
Menge	Reagenzien
2 µl	PCR-Produkt
2 µl	Dest. Wasser
1 µl	Linearisierter pCR II -TOPO Vektor

Der TOPO Cloning Reaktionsansatz wurde vorsichtig gemischt und genau 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Ein Ansatz enthielt die p33ING1 PCR-Produkte von Normalhautfibroblasten-cDNA, der andere die IL-6 PCR-Produkte von cDNA von synovialen RA-Fibroblasten. Anschließend wurde sofort mit der Transformation der TOP10 One Shot-Zellen (veränderte E. coli Bakterien) begonnen. Diese Zellen sind fähig den Vektor mit dem integrierten PCR-Produkt aufzunehmen. Dazu wurden TOP10 One Shot Zellen auf Eis aufgetaut, 2 µl des TOPO Cloning Reaktionsansatzes zugegeben, sanft gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden dann 30 sek bei 42°C hitzeschockiert und sofort wieder auf Eis gegeben und 2 min inkubiert. Nach steriler Zugabe von 250 µl SOC Medium (Raumtemperatur) wurde die Mischung 30 min bei 37°C im Thermoblock geschüttelt. 70µl der Probe wurden steril auf eine Platte mit LB-Medium und 50µg/ml Ampicillin aufgebracht und ausplattiniert. Der Vektor, der integriert werden sollte, enthielt eine Ampicillin-Resistenz. So konnten nur Zellen, die den Vektor mit der Ampicillin-Resistenz enthielten, auf der Ampicillin-Platte wachsen. Ein zusätzlich im Genom des Vektors enthaltenes Gen für β -Galaktosidase (Lac Z alpha), ermöglichte die Unterscheidung zwischen Zellen, die nur den Vektor enthielten und solchen, die den Vektor mit eingebautem PCR-Produkt enthielten, da das eingefügte PCR-Produkt das Lac Z alpha Gen unterbrach und die Trägerzellen so keinen blauen Farbstoff mehr produzieren konnten, welcher bei den Nichtträgerzellen durch die Aktivität des Lac Z alpha Gens gebildet wurde.

Material und Methoden

Vektorkarte (s. Abbildung 6):

Abbildung 6:



Nachdem die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert wurden, wählten wir weiße Kolonien, die mit hoher Wahrscheinlichkeit das PCR-Produkt enthielten, um aus diesen dann Flüssigkulturen zur Vermehrung herzustellen.

2.2.4. Flüssigkulturen

In ein Tube mit luftdurchlässigem Deckel wurden steril 5µl Ampicillin und 5ml LB-Medium pipettiert. Die gewünschte einzelne Bakterienkolonie wurde mit einer hitzesterilisierten Öse abgeimpft und in das Medium abgestreift. Die Bakterien wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und geschüttelt. Bei einer Trübung des

Material und Methoden

Mediums wurde davon ausgegangen, daß sich genügend Bakterien für die Plasmidisolierung gebildet hatten. Die Zellsuspension wurde bei 6000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das entstandene Pellet der Plasmidisolierung zugeführt.

2.2.5 Plasmidisolierung

Die Plasmidisolierung wurde mit QIAprep Spin Miniprep Kit nach Anleitung durchgeführt. Die Zellen wurden durch alkalische Lyse aufgeschlossen und die DNA über Absorptionschromatographie an einer Silicamembran (QIAprep Spin Miniprep Kit) gereinigt. Das Bakterienpellet wurde in 250 µl Puffer P1 (nach Zugabe von RNase A) resuspendiert und in ein Eppendorfcup pipettiert. 250 µl Puffer P2 wurden hinzugefügt, um die Bakterien zu lysieren. Durch vorsichtiges Kippen wurde die Lösung gemischt bis sie viskös wurde und anschließend mit Puffer N3 neutralisiert.

Diese Mischung wurde 10 min in der Tischzentrifuge auf höchster Stufe zentrifugiert, um die lysierten Zellbestandteile abzusondern. Der Überstand, in dem sich das zu isolierende Plasmid befand, wurde auf eine QIAprep Säule dekantiert. Diese Säule wurde auf ein Eppendorfcup gesetzt und für 60 s zentrifugiert. Hierbei band sich das Plasmid an die Säule und der Durchfluß wurde verworfen. Es folgten 2 Waschschrte mit 0,5 bzw. 0,75 ml Waschpuffer PB. Der bei der 60 Sekunden Zentrifugation entstehende Durchfluß wurde jeweils verworfen und die Säule noch einmal 60 s zentrifugiert, um verbliebenen Waschpuffer zu entfernen. Danach wurde das Plasmid in ein frisches 1,5 ml Eppendorfcup eluiert, indem 50 µl Eluationspuffer EB oder Wasser auf das Zentrum der Säule pipettiert wurden und nach einer Inkubationszeit von einer Minute durch einminütiges Zentrifugieren das Eluat extrahiert wurde.

Zum Nachweis der Plasmidisolierung wurde 1 µl des durch die Plasmidisolierung gewonnenen Eluats mit einem µl Loading Buffer gemischt und auf einem 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.6. Plasmidverdau

Um zu überprüfen, ob die Plasmide ein Insert (eingebautes PCR-Produkt) enthielten, wurden sie mit dem Restriktionsenzym EcoR1 verdaut. Wie auf der Vektorkarte (Abbildung Nr. 6) ersichtlich ist, liegen die Schnittstellen des Restriktionsenzym EcoR1 in direkter Nachbarschaft zur vorgesehenen Einbaustelle des PCR-Produkts in den Vektor.

Material und Methoden

Hierzu wurde folgender Reaktionsansatz gewählt:

Tabelle 15:

Menge	Reagenzien
10 µl	Plasmid
1 µl	Enzym Eco R1
2 µl	Puffer
7 µl	Dest. Wasser

Der Reaktionsansatz wurde im Thermoblock 2h bei 37°C inkubiert.

Zum Nachweis des Plasmidverdau wurde 1 µl des Reaktionsansatzes mit einem 1µl Loading Buffer gemischt und auf einem 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. An der Größe des entstandenen Produkts konnte erkannt werden, ob das PCR-Produkt eingebaut wurde.

2.2.7. M 13 –PCR

Zum weiteren Nachweis des eingebauten PCR-Inserts wurde eine PCR mit M 13-Primern gestartet. Wie auf der Vektorkarte (Abbildung Nr. 6) ersichtlich, wird bei einer PCR mit M13-Primern ein 230 Basenpaar (BP) langes Stück vervielfältigt, wenn kein Insert vorhanden ist. Wurde das Insert eingebaut, so hat das produzierte Stück die Länge von 230 BP + die Länge des Inserts.

In unserem Fall wurden also für die Plasmide, die p33ING PCR-Produkte eingebaut haben sollten, 611 BP lange Stücke als Produkt der PCR-Amplifikation erwartet. Für Plasmide mit eingebautem IL-6-PCR-Produkt wurden 570 BP lange Stücke erwartet.

Ansatz für die PCR:

Tabelle 16:

Menge	Reagenzien
1 µl	Plasmid
10 µl	Supermix Quiagen mit Taq Polymerase
1 µl	Primermix M13 (reverse+forward 1:10 verdünnt)
8 µl	Dest. Wasser

Material und Methoden

Die PCR durchlief im Thermocycler folgende Schritte in 35 Zyklen:

Denaturierung bei 94°C für 2 min.

Annealing bei 53°C für 3 min.

Extension bei 72°C für 2 min.

Zum Nachweis der vervielfältigten PCR-Produkte wurden 5 µl PCR-Ansatz mit 5 µl Loading Buffer vermischt und auf einem 1,5 % Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.8. Maxi Plasmid Präparation

Aus den Bakterienkolonien, die nachgewiesenermaßen das Plasmid mit eingebautem Insert enthielten, wurde eine größere Menge an Plasmid gewonnen.

Hierzu wurden, wie in Punkt 2.6. beschrieben, Flüssigkulturen hergestellt. Von dieser über Nacht inkubierten Vorkultur wurden 2ml auf 100 ml LB-Medium (+ 100µl Ampicillin) abgeimpft und nochmals bei 37°C auf einem Laborschüttler über Nacht inkubiert. Die Bakterienzellen wurden durch Zentrifugation (6000xg) sedimentiert, der Überstand verworfen. Gemäß der Anleitung des QIAGEN Plasmid Maxi Kit wurde das Pellet mit 10 ml des Puffers P1 resuspendiert, dann wurden die Bakterien durch Zugabe des Puffers P2 und vorsichtiges Mischen lysiert. Nach einer 5 minütigen Inkubation wurde das Lysat mit 10 ml Puffer P3 präzipitiert. Dieses Präzipitat wurde durch 30 min Zentrifugieren bei 20000xg von dem Plasmid enthaltenden Überstand getrennt. Der Überstand wurde nochmals durch 15 minütiges Zentrifugieren von verbliebenen Präzipitatresten getrennt und sofort in ein sauberes Zentrifugationsröhrchen abgekippt. Die QIAGEN-tip 500 Säulen wurden mit 10 ml Puffer QBT äquilibriert und anschließend zügig mit dem Überstand gefüllt. Die Säule wurde mit 2x30 ml Puffer QC gewaschen und das Plasmid mit 15 ml Puffer QF daraus eluiert.

Die gewonnene DNA wurde mit 10,5 ml raumtemperiertem Isopropanol präzipitiert und durch 30 min Zentrifugieren bei 15000xg sedimentiert. Der Überstand wurde dekantiert. Das Pellet wurde mit 5 ml 70%igem Ethanol gewaschen, wieder 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das luftgetrocknete Pellet wurde in 10mM Tris-Cl Puffer (pH 8,5) aufgelöst.

Material und Methoden

2.2.9. Plasmidfällung

Zur späteren Sequenzierung wurde ein Teil des gewonnenen Plasmids gefällt und getrocknet.

Dafür wurde folgender Ansatz verwendet:

Tabelle 17:

Menge	Reagenzien
30 µl	Plasmidprobe
3 µl	Natrium-Acetat
75 µl	Eiskalter 100% Ethanol

Diese Mischung wurde einige Stunden auf -20°C gekühlt, dann in der Kühlzentrifuge 30min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Nach Zugabe von 70% Ethanol wurde nochmals 30 min zentrifugiert und erneut der Überstand abgesaugt. Das verbliebene Pellet wurde getrocknet.

2.2.10. Plasmidsequenzierung

Die getrockneten Pellets wurden zu MWG-Biotech (www.mwg-biotech.de) zum Sequenzieren geschickt. Die erhaltene Sequenz wurde im BLAST 32-Search Computerprogramm überprüft, um festzustellen, ob der Vektor das gewünschte PCR-Produkt fehlerfrei eingebaut hatte. Dazu wurde die Basenfolge der sequenzierten Pellets mit der Basenfolge der gewünschten und in der BLAST 32-Search-Datenbank gespeicherten Genabschnitte verglichen.

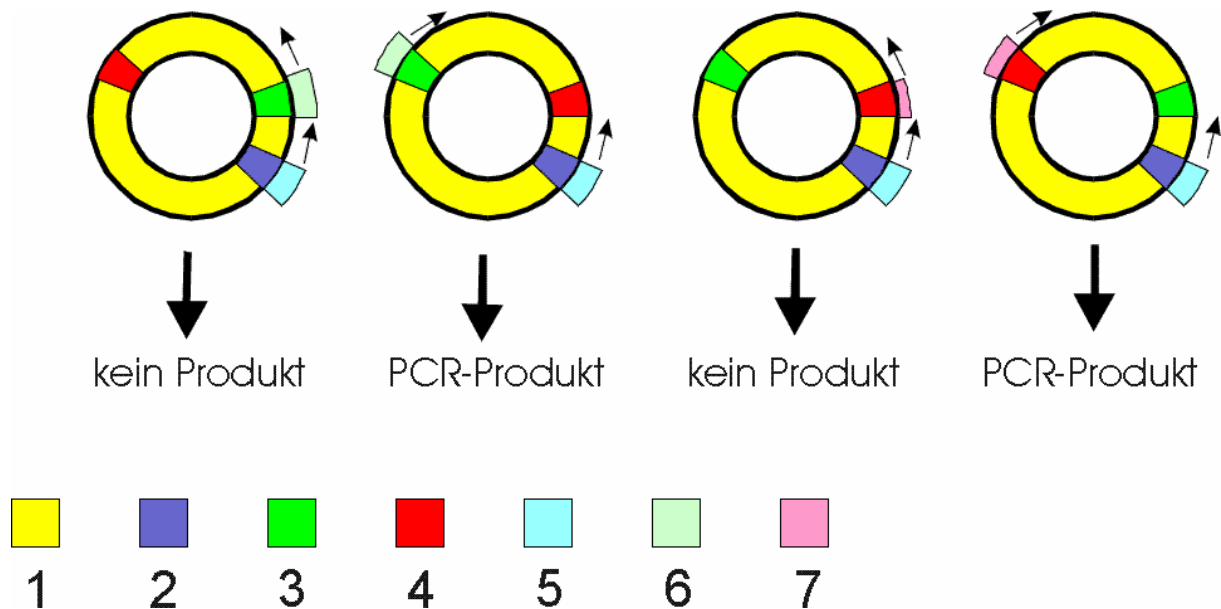
2.2.11. Testung der Richtung des eingebauten Inserts

Um zu testen, in welcher Ausrichtung sich das PCR-Produkt in den Vektor eingelagert hatte, wurde folgende PCR durchgeführt: Der M13 forward-Primer wurde einmal mit dem forward-Primer des eingebauten PCR-Produkts kombiniert und das andere Mal mit dem entsprechenden reverse-Primer. Dies führte dazu, dass das eingebaute PCR-Produkt nur dann vervielfältigt wurde, wenn der benutzte Primer am richtigen Ende des PCR-Produktes gebunden hatte. Das gewünschte Produkt hatte eine Länge von ca. 500 BP.

Material und Methoden

Die einzelnen Schritte illustriert folgende Grafik (s. Abbildung 7):

Abbildung 7: Prinzip der Testung der Richtung des eingebauten Inserts



Bildindex:

Nr. 1 (gelb):

Vektor pCR II.TOPO-Vektor (Plasmid)

Nr. 2 (dunkelblau):

Ort der entsprechenden Basensequenz für den M13-Forward-Primer

Nr.3.(grün):

Ort der entsprechenden Basensequenz für den forward-Primer des eingebauten PCR-Produkts

Nr.4 (rot):

Ort der entsprechenden Basensequenz für den reverse-Primer des eingebauten PCR-Produkts

Nr. 5 (hellblau):

M13-Forward-Primer

Nr. 6 (hellgrün):

forward-Primer des eingebauten PCR-Produkts

Nr. 7 (rosa):

reverse-Primer des eingebauten PCR-Produkts

Material und Methoden

2.2.12. Plasmidverdau zum Einbau in den pcDNA3.1 Vektor

Hier wurden zwei unterschiedliche Methoden für p33ING1 und IL-6 angewandt.

Methode für die alle in eine Richtung eingebauten IL-6-PCR-Produkte:

Der Topo-Vektor wurde mit dem Enzym EcoR1 geschnitten, so dass das ausgeschnittene IL-6 Stück zwei gleiche freie Enden besaß und in den ebenfalls mit EcoR1 geschnittenen pcDNA3.1-Vektor auf 2 Arten eingebaut werden konnte. Der Einbau in gegensinnigen Richtungen, sollte dazu führen, dass bei der späteren Transkription der pcDNA3.1-Vektor-DNA in mRNA sowohl sense-, als auch antisense-mRNA entsteht.

Ansatz für IL-6:

Tabelle 18:

Menge	Reagenzien
10 µl	Plasmidprobe IL-6 in Topo-Vektor
2 µl	Enzym EcoR1
2 µl	Puffer
2 µl	1:10 verdünntes BSA
4 µl	Dest. Wasser

Und:

Tabelle 19:

Menge	Reagenzien
30 µl	pcDNA 3.1 Vektor
2 µl	Enzym EcoR1
5 µl	Puffer
5 µl	1:10 verdünntes BSA
12,5 µl	Dest. Wasser

Die Reaktionsansätze wurden für 2 h bei 37°C inkubiert und anschließend auf einem 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Material und Methoden

Methode für die in unterschiedlicher Richtung eingebauten p33ING1-PCR-Produkte:

Der Topo-Vektor und der pcDNA-Vektor wurden jeweils mit EcoR5 und BamH1 geschnitten. Eco R5 und BamH1 besitzen in beiden Vektoren nur eine Schnittstelle (Abbildung Nr. 6 und Nr. 8), so dass die Stücke mit den 2 unterschiedlichen freien Enden nur auf eine Art in den pcDNA-Vektor eingebaut werden konnten. Nachdem 2 Topo-Vektor-Plasmide gewählt wurden, die das p33ING1-PCR-Produkt in gegensinniger Direktion eingebaut hatten, durfte davon ausgegangen werden, dass auf diese Weise bei der späteren Ligation Plasmide entstehen, die bei der Transkription entweder sense-mRNA oder antisense-mRNA produzieren.

Ansatz für p33ING1:

Tabelle 20:

Menge	Reagenzien
10 µl	Plasmidprobe p33ING1
1 µl	Enzym EcoR5
1 µl	Enzym Bam H1
2 µl	Puffer
2 µl	1:10 verdünntes BSA
4 µl	Dest. Wasser

Und:

Tabelle 21:

Menge	Reagenzien
30 µl	pcDNA 3.1 Vektor
2 µl	Enzym EcoR5
2 µl	Enzym Bam H1
5 µl	Puffer
5 µl	1:10 verdünntes BSA
10,5 µl	Dest. Wasser

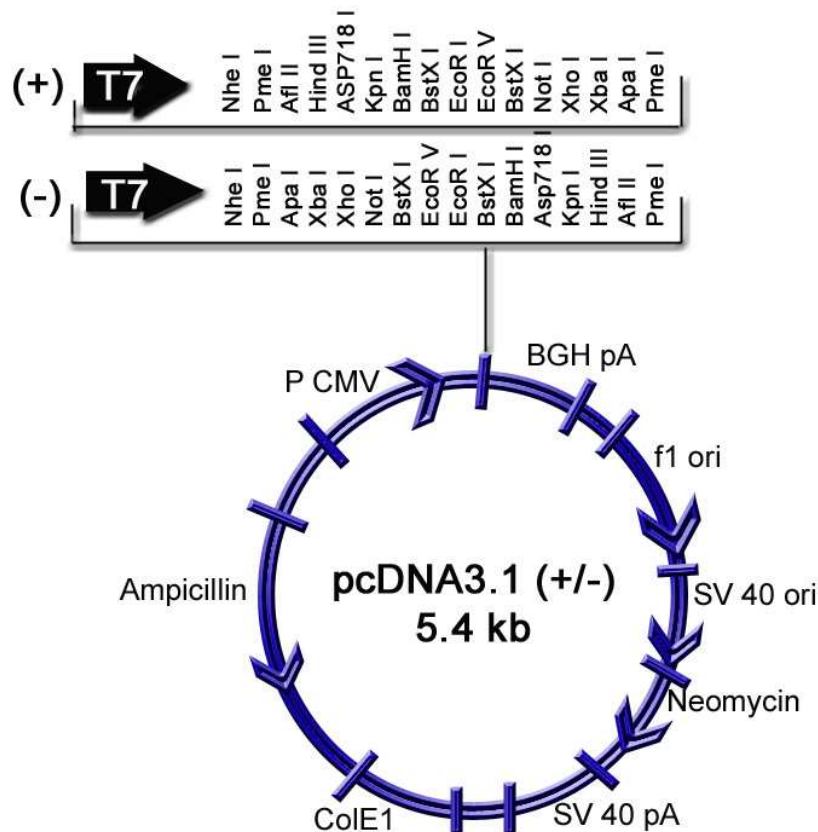
Die Ansätze wurden 2 h bei 37°C inkubiert und anschließend auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt.

Material und Methoden

Abbildung 8: Vektorkarte des pcDNA3.1-Vektors

Kommentar für pcDNA3.1 (+)
5432 Nucleotide

CMV Promotor: Basen 209-863
T7 Promoter: Basen 863-882
f1 origin: Basen 1298-1711
Neomycin Resistenz: Basen 2137-2931
ColE1 origin: Basen 3618-4291
Ampicillin Resistenz: 4436-5297



2.2.13. Gelextraktion des gewünschten Plasmidstücks

Aus dem Agarosegel wurden die gewünschten Stücke mit dem Skalpell ausgeschnitten und die DNA mittels QIAquick Gel extraction Kit aus dem Gelstück isoliert.

Hierzu wurde das ausgeschnittene Stück Gel gewogen und mit dem 3-fachen Volumen an Puffer QG versetzt. Diese Mischung wurde solange bei 50 °C inkubiert, bis sich das Gel vollständig aufgelöst hatte. Der nötige pH wurde anhand des Farbumschlags des Puffers bestimmt. War die Lösung weiterhin gelb, konnte sofort

Material und Methoden

mit dem Protokoll fortgefahren werden, hatte sich die Lösung orange oder violett verfärbt, mußten 10 µl 3 M Natriumacetat zugegeben werden. Anschließend wurde dem Gewicht des Gelstücks entsprechend (100 mg entsprechen 100 µl) die einfache Menge Isopropanol hinzugefügt und gemischt. Die QIAquick Säule wurde auf einem 2ml Eppendorfcup plziert, die Reaktionlösung auf die Säule appliziert und eine Minute zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen. Die Säule wurde erst mit 0,5 ml Puffer QG gewaschen und für 1 min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit 0,75 ml Puffer PE wiederholt. Nach Verwerfen des Durchflusses wurde die Säule nochmals 1 min zentrifugiert und danach in ein sauberes 1,5 ml Eppendorfcup umgesetzt. Die DNA wurde mit 50 bzw. 30 µl EB Puffer eluiert, indem dieser ins Zentrum der Säule pipettiert, 1 min gewartet, und dann die Säule auf höchster Stufe 1 min zentrifugiert wurde.

Die isolierte DNA-Menge wurde nach folgendem Rezept gefällt:

Tabelle 22:

Menge	Reagenzien
50 µl	Plasmidprobe
5 µl	Natrium-Acetat
125 µl	Eiskalter 100% Ethanol

Mit obigem Reaktionsansatz wurde wie in 2.11. beschrieben verfahren. Das Pellet des pcDNA-Vektor wurde in 30µl H₂O wiederaufgenommen, die ausgeschnittenen Stücke aus dem Topo-Vektor in 10 µl.

2.2.14. Ligation des Vektors pcDNA 3.1 mit dem Plasmidstück

Die Ligation des linearisierten und isolierten pcDNA-Vektors mit den linearisierten, aus dem Topo-Vektor ausgeschnittenen und isolierten PCR-Produkten erfolgte in einer auf 37°C aufgewärmten Styroporschachtel, die langsam über Nacht auf 4°C herunterkühlt wurde. Während dieser Zeit verbanden sich die freien Enden des pcDNA-Vektors mit den freien Enden der aus dem Topo-Vektor ausgeschnittenen DNA-Abschnitte.

Folgende Ansätze wurden gemischt, zentrifugiert und wie oben beschrieben in einer Styroporschachtel inkubiert.

Material und Methoden

Für IL-6:

Tabelle 23:

Menge	Reagenzien
5 µl	pcDNA 3.1 Vektor linearisiert mit EcoR1
5 µl	mit EcoR1 ausgeschnittene IL-6 Stücke
2 µl	Puffer
1 µl	Ligase
7 µl	Dest. Wasser

Für p33ING1:

Tabelle 24:

Menge	Reagenzien
5 µl	pcDNA 3.1 Vektor linearisiert mit BamH1 und EcoR5
5 µl	mit BamH1 und EcoR5 ausgeschnittene p33ING1-Stücke in sense-Richtung
2 µl	Puffer
1 µl	Ligase
7 µl	Dest. Wasser

und :

Tabelle 25:

Menge	Reagenzien
5 µl	pcDNA 3.1 Vektor linearisiert mit BamH1 und EcoR5
5 µl	mit BamH1 und EcoR5 ausgeschnittene p33ING1-Stücke in antisense-Richtung
2 µl	Puffer
1 µl	Ligase
7 µl	Dest. Wasser

Die Überprüfung des Ligationserfolges erfolgte mittels Gelelektrophorese.

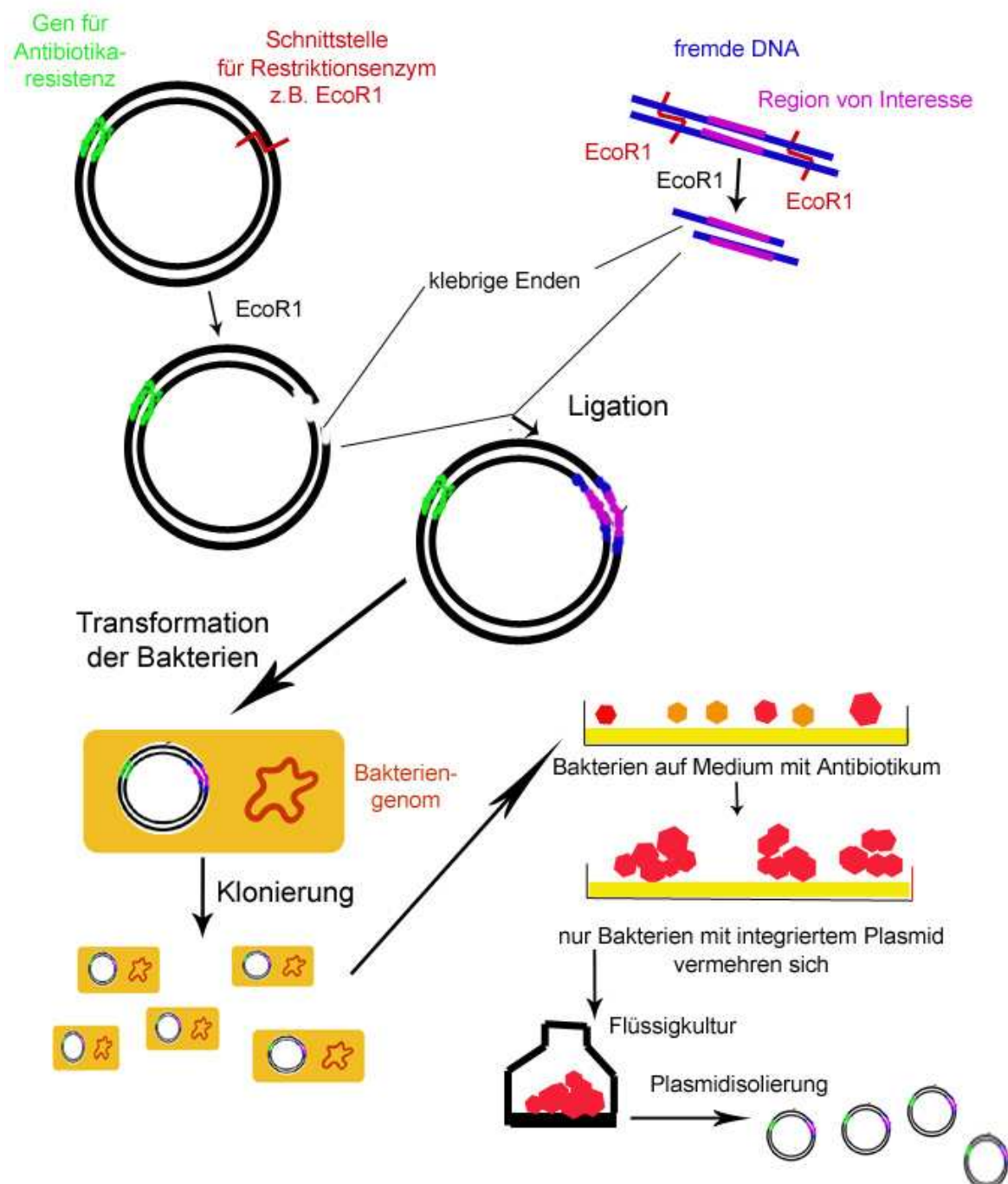
Material und Methoden

2.2.15. Transformation und Klonierung mit obiger Ligation

Nach der in Punkt 2.2.3 beschriebenen Methode wurden die TOP10 One Shot Zellen mit der Ligation aus pcDNA und IL-6 oder wahlweise einer der beiden Ligationen aus pcDNA und p33ING1 transformiert und entsprechend kloniert.

Von den vermehrten Bakterien wurden, wie in Methoden 2.2.4. beschrieben, Flüssigkulturen hergestellt. (Abbildung 9)

Abbildung 9: Prinzip der Ligation, Transformation und Klonierung



Material und Methoden

2.2.16. Plasmidisolierung aus Bakterien mit integriertem pcDNA-Vektor

Aus den Bakterien wurden nach dem Protokoll von QIAgen, wie in Punkt 2.2.5. beschrieben, die Plasmide isoliert.

Um zu testen, ob die Plasmide das gewünschte Insert enthalten, wurde ein Verdau angeschlossen.

Folgender Ansatz wurde 2-3h bei 37°C inkubiert:

Tabelle 26:

Menge	Reagenzien
5 µl	Plasmid
1 µl	Enzym BamH1
1 µl	Enzym EcoR5
2 µl	Puffer 10x
2 µl	BSA 100x ,1:10 verdünnt
9 µl	Dest. Wasser

Der Reaktionsansatz wurde auf 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.17. Alternative Strategie für den Einbau des IL-6 Inserts

Die Primer für die PCR zur Vervielfältigung des gewünschten IL-6-Abschnitts wurden um die Sequenz der Schnittstellen von BamH1 oder EcoR5 verlängert. Ziel war es, ein PCR-Produkt mit zwei unterschiedlichen Enden zu erhalten, das sich nur auf eine Art und Weise in den, mit BamH1 und EcoR5 linearisierten Vektor einfügen lässt.

Das IL-6-Insert sollte genau wie das p33ING1-Insert in zwei unterschiedlichen Richtungen in den Vektor eingebaut werden, um bei der Transkription sense- und antisense-mRNA zu erhalten. Für die eine Richtung wurde der ursprüngliche forward-Primer um die Sequenz der Schnittstelle von BamH1 verlängert, der ursprüngliche reverse-Primer um die Sequenz der Schnittstelle von EcoR5. Die Primer für die andere Richtung wurden nach dem gleichen Prinzip hergestellt, nur daß der ursprüngliche Forward-Primer um EcoR5 verlängert wurde und der ursprüngliche reverse-Primer um BamH1. An alle Primer wurden 3 GC-Sequenzen angehängt, weil dann die Restriktionsenzyme besser schneiden können.

Material und Methoden

So wurden folgende Primer entworfen:

IL-6 Bam:

5'-GCG CGC GGA TCC CGG CAT CTC AGC CCT GAG AA-3'

IL-6 Eco:

5'-CGC GCG GAT ATC CTT CGT CAG CAG GCT GGC AT-3'

IL-6 Bam R:

5'- CGC GCG GGA TCC TTC GTC AGC AGG CTG GCA T-3'

IL-6 Eco R:

5'-GCG CGC GAT ATC CGG CAT CTC AGC CCT GAG AA-3'

Die PCR wurde mit 4 verschiedenen cDNAs durchgeführt, davon stammten 2 von RA-Patienten, eine von OA-Patienten und eine von Normalhautfibroblasten.

Tabelle 27:

Menge	Reagenzien
5 µl	cDNA
10 µl	Supermix von Quiagen
1 µl	Primer IL-6 Bam oder Primer IL-6 Bam (R)
1 µl	Primer IL-6 Eco oder Primer IL-6 Eco (R)
3 µl	Dest. Wasser

Diese PCR lief 35 cycles lang und hatte eine annealing-Temperatur von 58°C.

Da für den Verdau, die Gelextraktion und spätere Ligation größere Mengen an PCR-Produkt benötigt wurden, wurde der PCR-Ansatz auf 50 µl erhöht und mit cDNA von RA-Patienten durchgeführt.

Tabelle 28:

Menge	Reagenzien
5 µl	cDNA
20 µl	Supermix von Quiagen
1 µl	Primer IL-6 Bam oder Primer IL-6 Bam (R)
1 µl	Primer IL-6 Eco oder Primer IL-6 Eco (R)
23 µl	Dest. Wasser

Material und Methoden

Gleiche PCR-Reaktionsbedingungen wie oben.

Die Reaktionsansätze mit PCR-Produkten wurden gefällt (siehe Punkt 2.2.13.) und in 10 µl wiederaufgenommen. Die PCR-Produkte und der Vektor pcDNA wurden mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut.

Für den Verdau wurden folgende Ansätze pipettiert:

Tabelle 29:

Menge	Reagenzien
3 µl	Vektor pcDNA
1 µl	Enzym BamH1
1 µl	Enzym EcoR5
2 µl	Puffer 10x
2 µl	BSA 100x ; 1:10 verdünnt
11 µl	Dest. Wasser

und:

Tabelle 30:

Menge	Reagenzien
10 µl	PCR-Produkt
1 µl	Enzym BamH1
1 µl	Enzym EcoR5
2 µl	Puffer 10x
2 µl	BSA 100x ; 1:10 verdünnt
11 µl	Dest. Wasser

Beide Ansätze wurden bei 37°C 2h inkubiert.

Gelextraktion der Banden nach QIAgen (siehe Punkt 2.2.13.).

Eluation in 30 µl.

Material und Methoden

50 µl Ligation :

Tabelle 31:

Menge	Reagenzien
5 µl	linearisierter pcDNA-Vektor
30 µl	PCR-Produkt der PCR mit IL6-Bam- und IL-6-Eco-Primer das anschließend wie in Tab. 29 beschrieben verdaut wurde
1 µl	T4 Ligase
5 µl	Ligase-Puffer 10x
9 µl	Dest. Wasser

und:

Tabelle 32:

Menge	Reagenzien
5 µl	linearisierter pcDNA-Vektor
10 µl	PCR-Produkt der PCR mit IL6-BamR- und IL-6-EcoR-Primer, das anschließend wie in Tab. 29 beschrieben verdaut wurde
1 µl	T4 Ligase
5 µl	Ligase-Puffer 10x
29 µl	Dest. Wasser

Mit dem Ligationsansatz wurde wie in Punkt 4.5. beschrieben verfahren.

Anschließend wurden mit den ligierten pcDNA-Vektoren One Shot TOP 10-Zellen transformiert (siehe Punkt 4.5.) und anschließend kloniert.

Material und Methoden

2.3. Herstellung von RNA-Sonden zur Transfektion

2.3.1. Plasmidlinearisierung

Um RNA-Sonden herstellen zu können, mussten zuerst die Plasmide (pCR®II-TOPO-Vektor) mit dem eingebauten Insert (IL-6 oder p33ING1) linearisiert werden. Die Linearisierung wurde wahlweise mit dem Restriktionsenzym EcoR5 oder mit dem Restriktionsenzym BamH1 durchgeführt.

Tabelle 33:

Menge	Reagenzien
40 µl	pCR II TOPO-Vektor (Plasmid) mit Insert
5 µl	10x Puffer passend zum Enzym
2 µl	Enzym (entweder EcoR5 oder BamH1)
5 µl	100x BSA, 1:10 verdünnt
2,5 µl	Dest. Wasser

Die Ansätze wurden 3 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden sie gefällt und das getrocknete Pellet in 20µl DEPC-Wasser resuspendiert.

2.3.2. RNA-Sonden Herstellung

Bei der Herstellung der RNA-Sonden wurde die DNA des linearisierten pCR®II-TOPO-Vektors in RNA überschrieben. Diese Transkription erfolgt einmal von der Stelle des T7-Promotors des Vektors bis zur Schnittstelle des BamH1 und das andere Mal von der Stelle des SP6-Promotors bis zur Schnittstelle des EcoR5 (siehe Vektorkarte Abbildung 6). Auf diese Weise erhält man zwei komplementäre gleichlange RNA-Stränge, von denen ein RNA-Strang der vom Plasmid produzierten mRNA entspricht (= sense) und der andere diesem genau komplementär ist (= anti-sense). In diesem Fall entspricht der mit der SP6-RNA-Polymerase überschriebene RNA-Strang der sense-Sonde und der mit der T7-RNA-Polymerase hergestellte RNA-Strang der anti-sense-Sonde.

Die RNA-Sonden wurden nach Anleitung des MaxiScript™ Kit der Fa. Ambion hergestellt.

Wurde der Vektor mit BamH1 linearisiert, so wurde er durch die T7 RNA-Polymerase in RNA überschrieben. Wenn der Vektor mit EcoR5 verdaut wurde, musste er durch die SP6 RNA-Polymerase in RNA überschrieben werden.

Material und Methoden

Tabelle 34:

Menge	Reagenzien
2 µl	10 mM ATP
2 µl	10 mM CTP
2 µl	10 mM GTP
1,2 µl	10 mM UTP
0,8 µl	10 mM labeled UTP-Digoxigenin-UTP
19 µl	Linearisierter Vektor (BamH1 oder EcoR5)
4 µl	RNA-Polymerase (T7 oder SP6)
5 µl	Dest. Wasser

Dieser Ansatz wurde 2h bei 37°C inkubiert. Ein DNA- Verdau wurde angeschlossen, indem 2µl DNase (Enzym) auf den 40 µl Ansatz pipettiert wurden und diese Mischung 30 min bei 37°C inkubiert wurde. Danach wurde die Reaktion mit 2 µl EDTA (0,5 M) gestoppt. Zur Stabilisierung wurden noch 2 µl Glykogen zugegeben, bevor die Reaktion gefällt wurde. Das Pellet wurde in 100 µl DEPC-Wasser wiederaufgenommen und mit je 4 ml DTT (100mM) und RNase-Inhibitor versetzt.

Um doppelsträngige RNA herzustellen, wurden je 10 µl der T7 und der SP6 polymerisierten RNA-Stränge (sense und antisense) zusammenpipettiert, auf 80°C erhitzt und dann gekühlt.

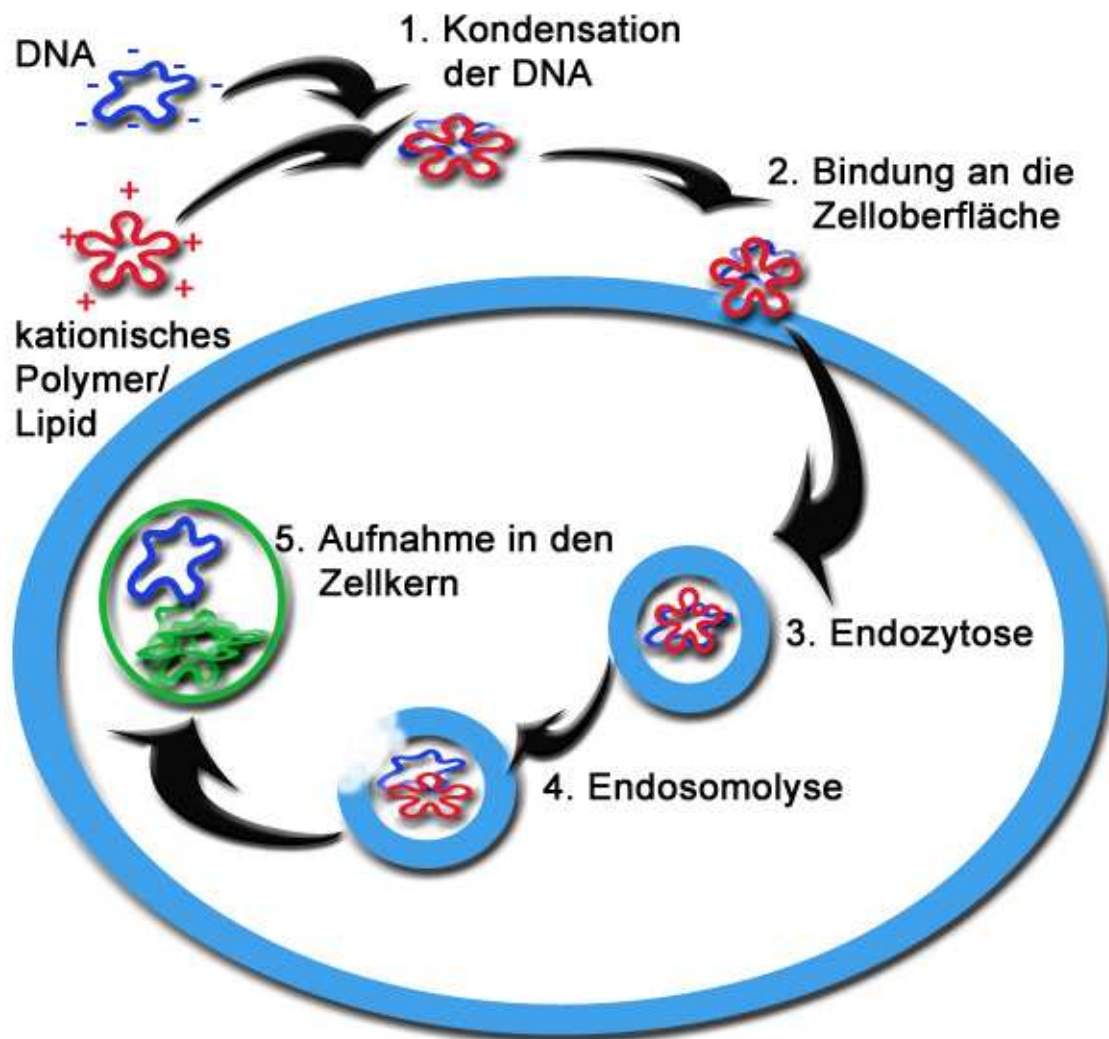
2.4. Nonvirale Transfektion

2.4.1. Prinzip der Lipotransfektion

Mittels kationischer Lipide oder Polymere läßt sich DNA in die Zelle einschleusen, da der kationische Teil des Lipids mit den negativ geladenen Bereichen der DNA wechselwirkt und so DNA und Lipid kondensieren. Hierbei bilden sich sogenannte Liposomen, in denen sich die Moleküle mit dem lipophilen Teil nach außen und dem hydrophilen Teil nach innen ausrichten. Mit dieser Zwitter-eigenschaft ist es kationischen Lipid-Molekülen möglich, einerseits DNA zu transportieren und andererseits die Lipidmembran der Zelle zu überwinden (Abbildung 10).

Material und Methoden

Abbildung 10: Prinzip der Lipotransfektion



Um in der Zelle Veränderungen hervorrufen zu können, muß die transfizierte DNA allerdings in den Zellkern gelangen. Der Mechanismus dieses Vorgangs ist nicht vollständig geklärt und dieser Schritt limitiert die Effektivität der nonviralen Transfektion.

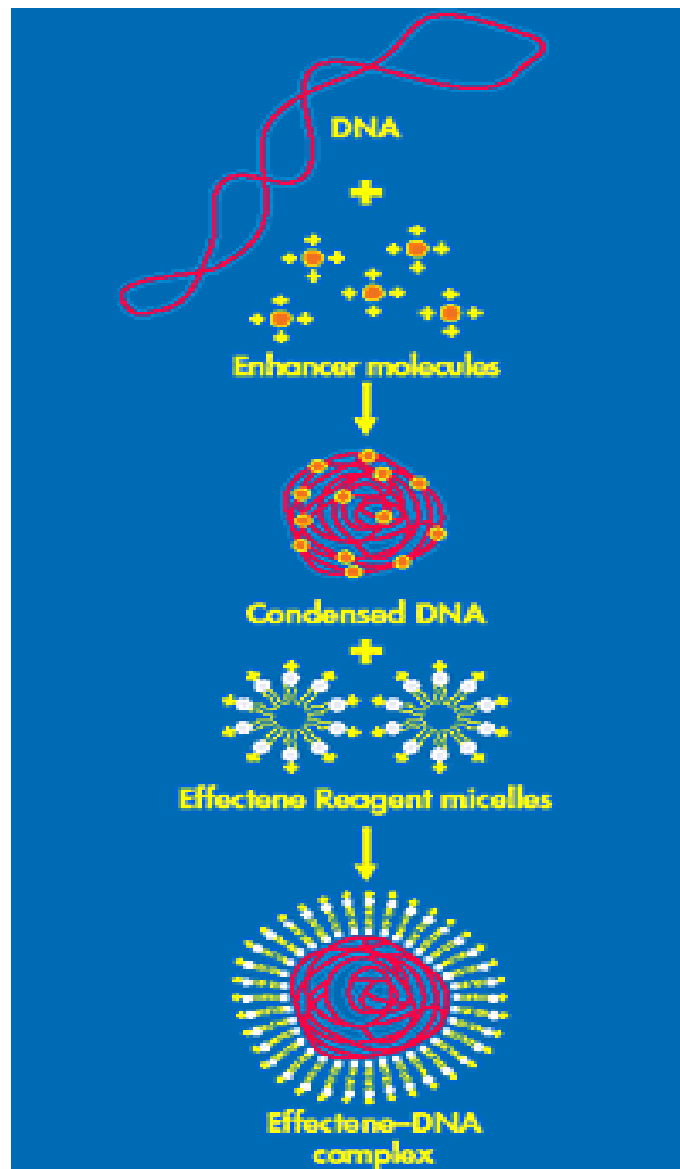
Material und Methoden

2.4.2. Transfektion von Fibroblasten mit RNA-Sonden und Effectene

Effectene ist ein nicht liposomales Lipid, das in Kombination mit einem DNA-kondensierenden Enhancer einen Effectene-DNA-Komplex bildet, der eine Transfektion der Zellen nach oben beschriebenem Prinzip ermöglicht.

Folgende Abbildung 11 verdeutlicht die Wirkungsweise.

Abbildung 11: Wirkungsweise des Effectene-Transfektionsreagenz



Die Transfektion wurde versuchsweise mit RNA (IL-6 sense-, antisense- und Doppelstrang-RNA) durchgeführt (Li 2004, Jana 2006), um anschließend Veränderungen in der IL-6 Produktion der Zellen mittels ELISA zu überprüfen.

Material und Methoden

Wenn die Fibroblasten-Zellkulturen gesplittet werden mussten (siehe 2.1.2), wurden 6-Well-Platten zum Transfizieren hergestellt. Hatten die Zellen in den Wells eine Konfluenz von 40-80% erreicht, wurde mit der Transfektion begonnen.

Die eingesetzte RNA hatte eine Konzentration von ca. 50ng/µl. Die Mischung aus RNA, EC-Buffer und Enhancer mußte ein Volumen von 100µl erreichen. Das führte zu folgendem Transfektionsschema:

Tabelle 35:

	1. Pipettierschritt	2. Pipettierschritt	3. Pipettierschritt
Cup für Well Nr.1	93,40 µl EC-Buffer	5 µl RNA: sense	1,6 µl Enhancer
Cup für Well Nr.2	93,40 µl EC-Buffer	5 µl RNA: antisense	1,6 µl Enhancer
Cup für Well Nr.3	97,15 µl EC-Buffer	1,25 µl RNA: Doppelstrang	1,6 µl Enhancer
Cup für Well Nr.4	95,90 µl EC-Buffer	2,5 µl RNA: Doppelstrang	1,6 µl Enhancer
Cup für Well Nr.5	94,65 µl EC-Buffer	3,75 µl RNA: Doppelstrang	1,6 µl Enhancer
Cup für Well Nr.6	98,40 µl EC-Buffer		1,6 µl Enhancer

Der Enhancer wurde immer als letztes zugegeben. Die autoklavierten Eppendorfcups wurden nach Zugabe des Enhancers gevortext und 2-5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Jedes Cup wurde dann mit 20 µl Effectene versetzt, wieder 10 sec gevortext und 5-10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Währenddessen wurde das Medium von den 6-wells abgesaugt und die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen. Dieses wurde wieder abgesaugt und in jedes well 1,6 ml frisches Medium vorgelegt.

Nach der Inkubationszeit wurde in jedes Eppendorfcup 600 µl frisches Medium zugefügt und durch Pipettieren gemischt. Diese Mischung wurde tropfenweise auf das entsprechende Well gegeben und leicht geschwenkt. Die 6-Well-Platte wurde 3 h im Brutschrank inkubiert.

Nach dieser Zeit wurde der Überstand abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und dann wieder mit frischem Medium bedeckt und zurück in den Brutschrank gestellt.

Für den IL-6 ELISA wurden nach 24 h, 48 h und 72 h 500µl Zellkulturmedium aus jedem Well abgenommen.

Material und Methoden

2.4.3. Transfektion mit Plasmiden und diversen Liporeagenzien

2.4.3.1. Transfektion mit Effectene™ der Firma QIAGEN®

Das Effectene™ Transfektions-Reagens basiert auf einem nicht-liposomalen Lipid, das in Kombination mit einem spezifischen DNA-Kondensationsverstärker und zugehörigem Puffer die Transfektion ermöglicht (siehe Abbildung 10). Im ersten Schritt kondensiert die DNA unter Einwirkung des DNA-condensing Enhancers in einem definierten Puffersystem. Im zweiten Schritt wird Effectene™ zugegeben und es bildet sich ein kondensierter Effectene-DNA-Komplex. Dieser Komplex wird mit Zellkulturmedium gemischt und auf die zu transfizierenden Zellen pipettiert. Das Effectene™ Reagens formt spontan gleichmäßige Mizellen, die in ihrem Zentrum die kondensierte DNA enthalten und durch den Effectene-Lipidmantel in die Zellen aufgenommen werden können.

Die praktische Vorgehensweise verdeutlicht untenstehende Grafik (Abbildung 12).

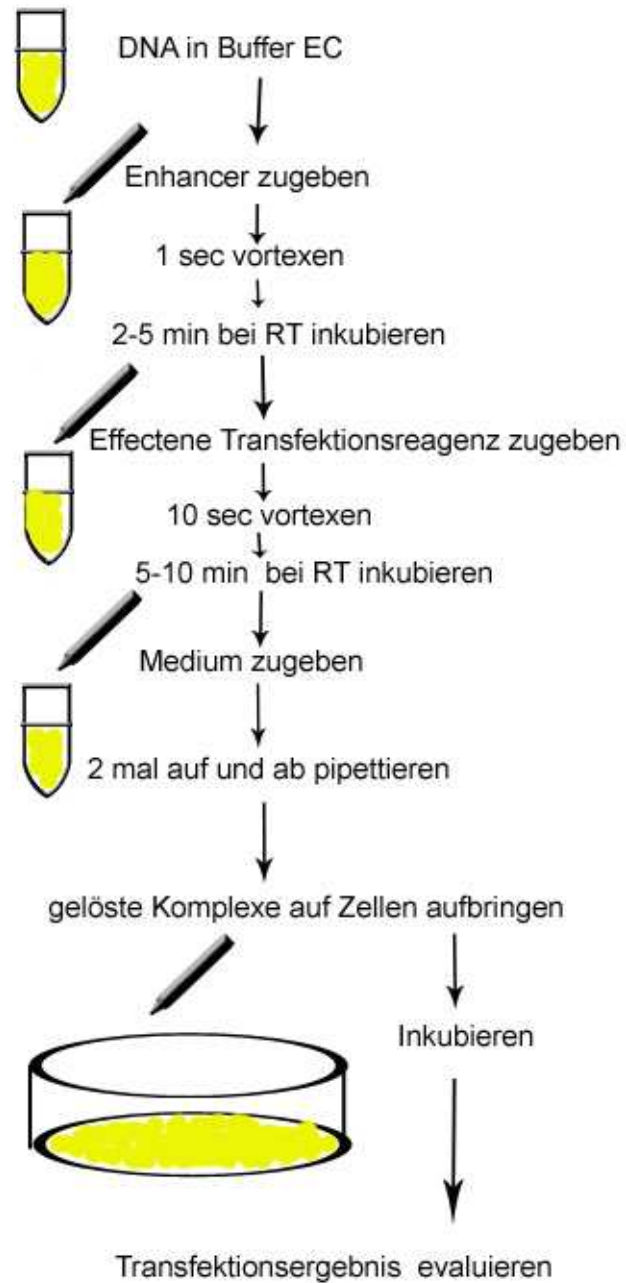
Um die Transfektion zu optimieren, mußten die verwendeten Mengen-Verhältnisse von DNA, DNA-condensing Enhancer und Effectene™ variiert werden.

Auch die Konfluenz der zu transfizierenden Zellen wurde variiert.

Material und Methoden

Abbildung 12: praktische Vorgehensweise bei Transfektionen mit Effectene

Transfektionsablauf für das Transfektionsreagenz Effectene



Material und Methoden

2.4.3.2. Transfektion mit SuperFect™ der Firma QIAGEN®

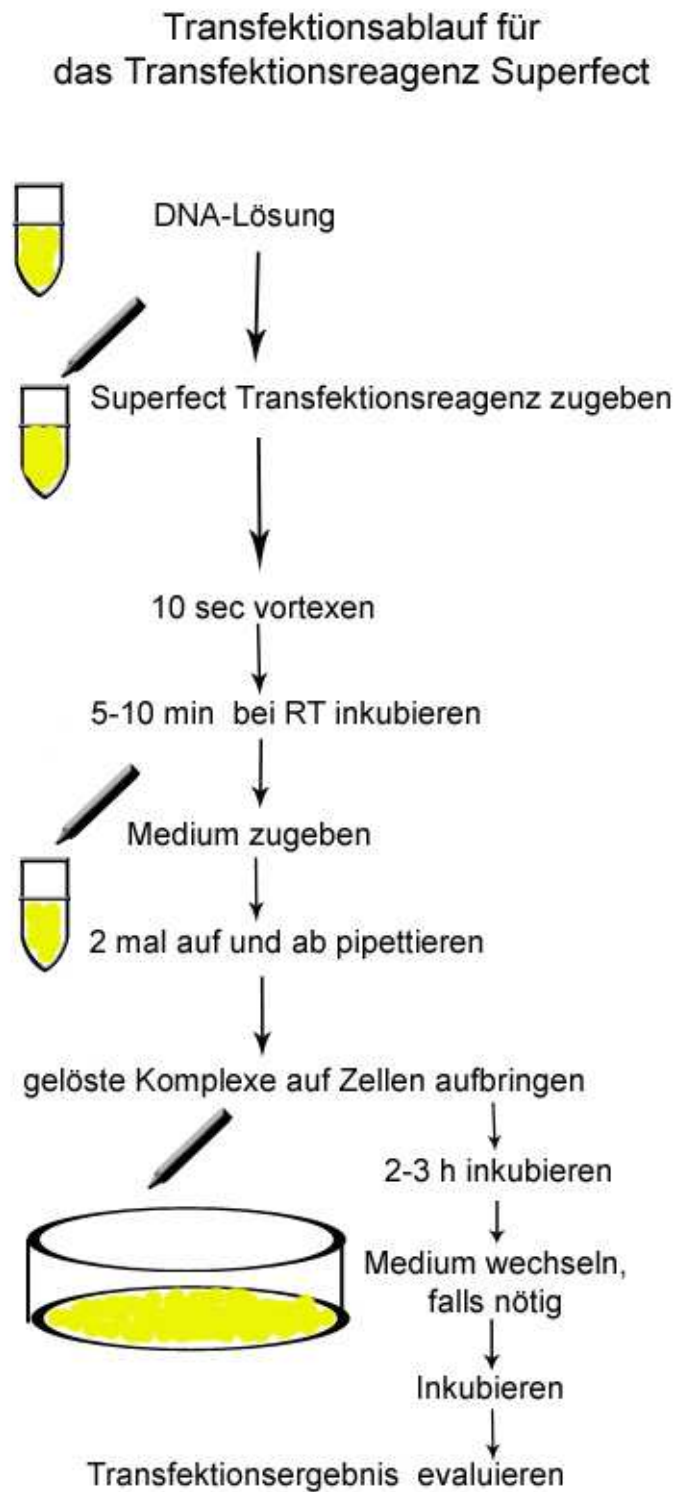
Das SuperFect™ Transfektions-Reagens ist ein speziell entworfenes aktiviertes Dendrimer. Die um einen zentralen Kern angeordneten Äste des Denrimers enden mit geladenen Aminogruppen. Dieses Transfektionsreagens verformt die DNA in eine kompakte Struktur und kann sich mit Hilfe seiner positiven Ladung an negativ geladene Rezeptoren an der Zelloberfläche eukaryoter Zellen binden. Einmal in die Zelle internalisiert, stabilisiert SuperFect™ die DNA.

Auch bei diesem System wurden zur Optimierung der Transfektion das Verhältnis von DNA-Menge zu SuperFect™-Menge und die Zelldichte im Well zum Zeitpunkt der Transfektion variiert.

Folgende Grafik verdeutlicht die praktische Vorgehensweise (Abbildung 13):

Material und Methoden

Abbildung 13: praktische Vorgehensweise bei Transfektionen mit Superfect



Material und Methoden

2.4.3.3. Transfektion mit FuGENE 6™ der Firma Roche®

Das FuGENE 6™ Transfektionsreagens ist eine Mischung aus vielen Komponenten auf Lipidbasis in 80%igem Ethanol. Dieses Reagens ist fähig, mit der DNA Komplexe zu bilden und diese während der Transfektion in die Zelle zu transportieren.

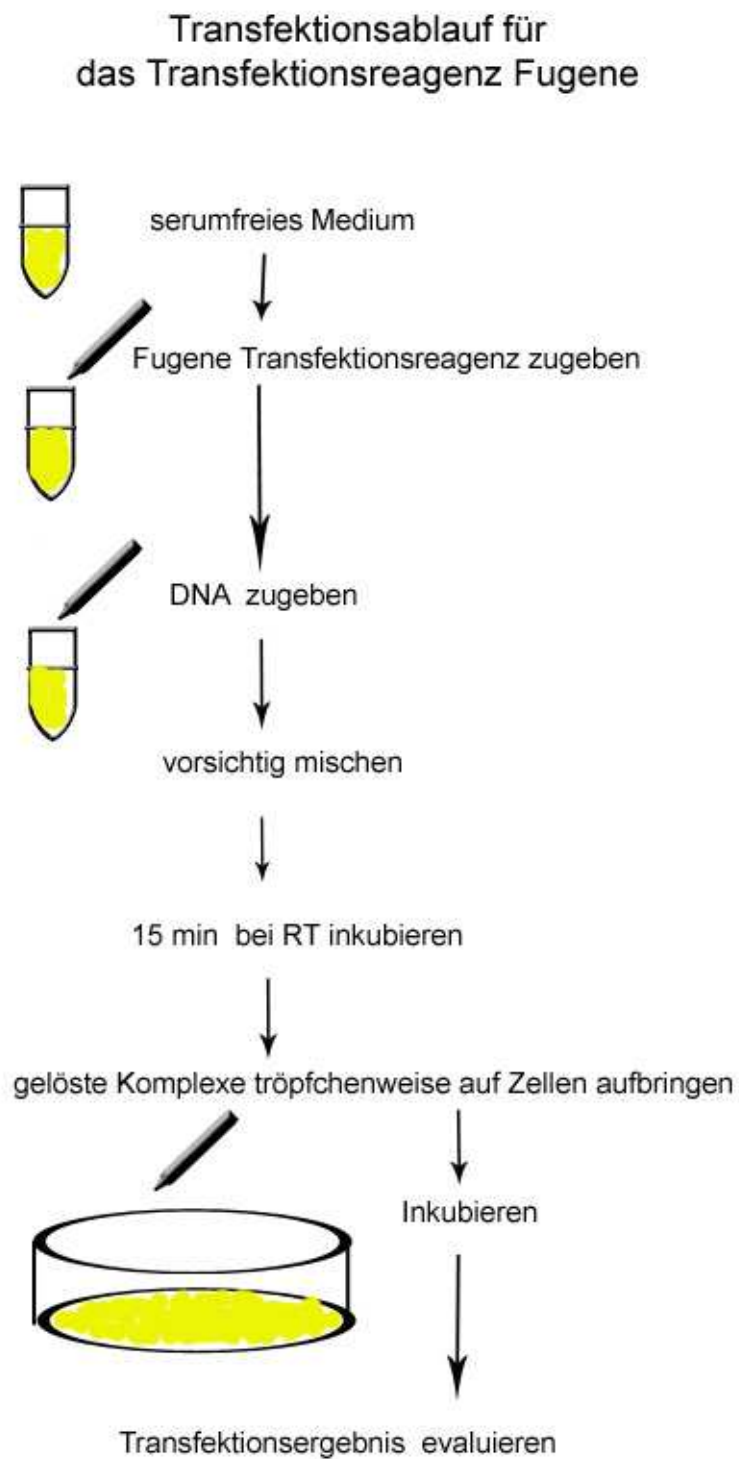
Dazu waren folgende Schritte nötig:

In ein steriles Cup wurde serumfreies Medium pipettiert und mit 3 bzw. 6 µl FuGENE6™ versetzt, so daß ein Gesamtvolumen von 100 µl erreicht wurde. Es wurde darauf geachtet, daß das unverdünnte FuGENE6™ nicht mit einer Plastikoberfläche in Kontakt kam. Danach wurden 1-2 µg DNA zugegeben und der Ansatz nach vorsichtigem Mischen 15 Minuten bei RT inkubiert. Nach dem Formen des DNA-FuGENE6-Komplexes wurde die Mischung tröpfchenweise auf die zu transfizierenden Wells pipettiert (Abbildung 14).

Während der Optimierung wurden DNA zu FuGENE6™ Verhältnisse verändert.

Material und Methoden

Abbildung 14: praktische Vorgehensweise bei Transfektionen mit Fugene



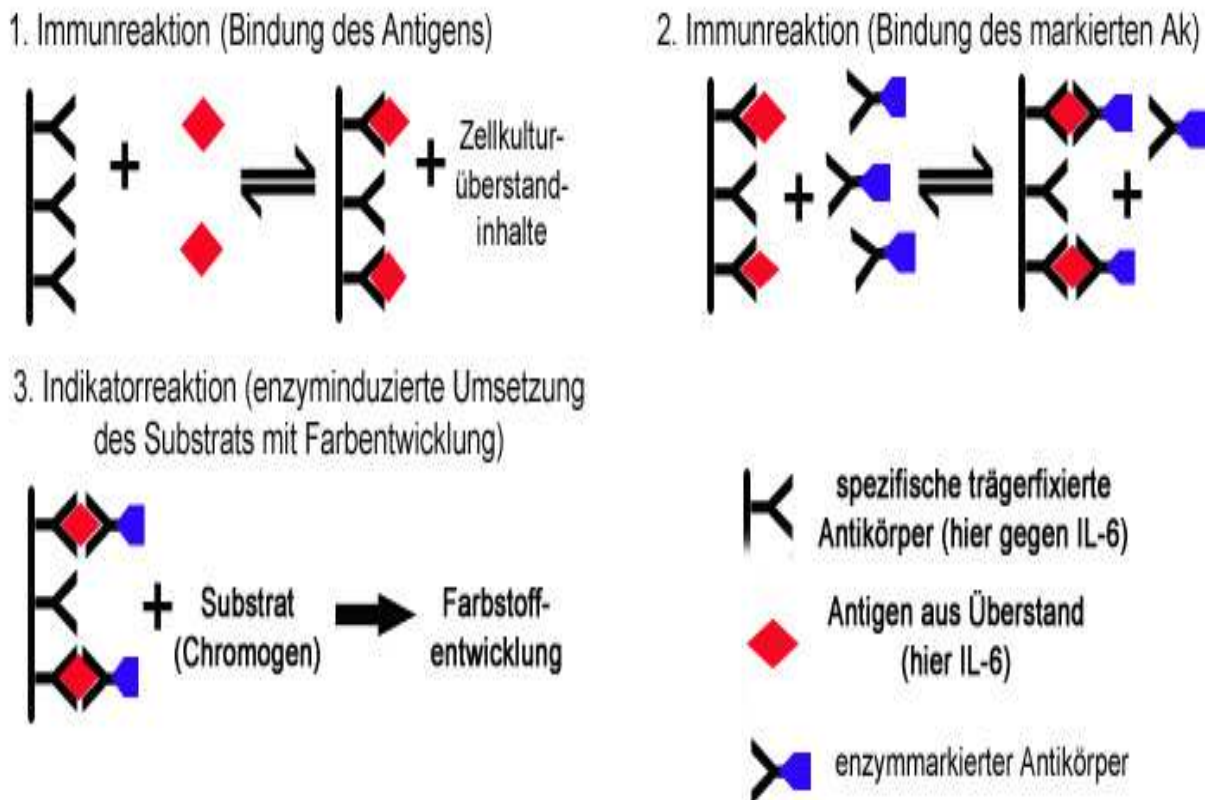
Material und Methoden

2.5. Nachweismethoden für die Transfektionen

2.5.1. IL-6 ELISA (Enzym-linked Immunosorbent Assay)

Ziel des IL-6 ELISAs war es, die Mengenunterschiede des von den transfizierten Fibroblasten produzierten IL-6 nachzuweisen. Dieses Verfahren wurde für die Transfektion mit RNA und Effectene™ verwendet. Hierzu wurden die abgenommenen Zellkulturüberstände auf ihren Gehalt an IL-6 mittels ELISA untersucht. Das in den Überständen enthaltene IL-6 wurde von den auf der ELISA-Platte gebundenen Antikörpern gebunden. Die Platte wurde gewaschen und mit einem IL-6-Antikörper mit gebundenem Enzym versetzt, der sich an das gebundene IL-6 band. Nach erneutem Waschen wurde Substrat zugesetzt, das je nach Menge des gebundenen Enzyms und damit auch des gebundenen IL-6 in einer chemischen Reaktion zu einem Farbwechsel führte. Dieser Farbwechsel konnte dann photometrisch nachgewiesen und der IL-6 Gehalt mittels Vergleich mit Standardverdünnungsreihen ermittelt werden (Abbildung 15).

Abbildung 15: Prinzip des ELISA



Material und Methoden

Nachdem die Reagenzien und Standards nach Anleitung des Quantikine® human IL-6 immunoassay-kits von R&D Systems vorbereitet waren, wurde die IL-6 Standardlösung von 300 pg/ml gemäß Herstelleranweisung in einer Verdünnungsreihe auf Konzentrationen von 100/50/25/12,5/6,25 und 3,12 pg/ml verdünnt. Als Nullwert (Standard) diente die Kalibratorlösung RD5A, mit der auch die Verdünnungen hergestellt wurden. In die mitgelieferten microplate Streifen, mit den gebundenen monoklonalen Antikörpern für humanes IL-6, wurde nun in jedes Well 100 µl Assay Diluent RD1A und anschließend entweder 100 µl der Standardverdünnungsreihe oder 100 µl des Überstands aus den transfizierten Wells pipettiert. Während der Inkubationszeit von 2 h konnte sich nun vorhandenes IL-6 an die spezifischen trägerfixierten Antikörper binden. Danach wurde jedes Well viermal mit dem Waschpuffer gewaschen und wieder abgesaugt. Nach der gründlichen Entfernung des letzten Waschpuffers durch Ausklopfen der Platte, wurde jedes Well mit 200 µl IL-6 Konjugat (polyklonaler Antikörper gegen IL-6, an den Peroxidase gebunden ist) bedeckt und 2 h bei RT inkubiert. Es schlossen sich wieder 4 Waschschrte an. Nun wurden jeweils 200 µl Substratlösung (Mischung aus Hydrogenperoxid und Tetramethylbenzidine) zugefügt und 20 min inkubiert. Die chemische Reaktion wurde mit 50 µl Stop-Lösung beendet und sofort die unterschiedliche Farbintensität photometrisch bei 450 nm bestimmt.

Pipettierschema der ELISA-Platte:

Tabelle 36:

	1	2	3	4	5	6
A	Standard 300	Standard 300	Ü1 / W1	Ü2 / W3	Ü3 / W5	Standard 300
B	Standard 100	Standard 100	Ü1 / W2	Ü2 / W4	Ü3 / W6	Standard 100
C	Standard 50	Standard 50	Ü1 / W3	Ü2 / W5	Ü4 / W1	Standard 50
D	Standard 25	Standard 25	Ü1 / W4	Ü2 / W6	Ü4 / W2	Standard 25
E	Standard 12,5	Standard 12,5	Ü1 / W5	Ü3 / W1	Ü4 / W3	Standard 12,5
F	Standard 6,25	Standard 6,25	Ü1 / W6	Ü3 / W2	Ü4 / W4	Standard 6,25
G	Standard 3,12	Standard 3,12	Ü2 / W1	Ü3 / W3	Ü4 / W5	Standard 3,12
H	Standard 0	Standard 0	Ü2 / W2	Ü3 / W4	Ü4 / W6	Standard 0

Standard: Standard in der jeweiligen Verdünnung in pg/ml
 Ü1: Überstand entnommen aus dem jeweiligen Well vor Transfektion
 Ü2: Überstand entnommen aus dem jeweiligen Well 24 h nach Transfektion
 Ü3: Überstand entnommen aus dem jeweiligen Well 48 h nach Transfektion
 Ü4: Überstand entnommen aus dem jeweiligen Well 72 h nach Transfektion
 W: Bezeichnung des jeweiligen Wells, Numerierung und Transfektion nach dem Schema in Punkt 2.21.

Material und Methoden

2.5.2. RNA-Isolierung

Aus den transfizierten Zellkulturen wurde bei 80-90 % Konfluenz der Zellen das Medium entfernt und die Wells mit PBS gewaschen. Zur Lyse der Zellen wurden pro 6-Well 350µl RLT-Lysepuffer, die mit β -Mercaptoethanol versetzt waren, verwendet. Das Lysat wurde mit dem Zellschaber abgeschabt und entweder bei - 80°C gelagert oder mit dem RNeasy[®] Spin Column Purification Kit der Firma Qiagen verarbeitet. Wurde RNA aus Zellkulturflaschen isoliert, wurden 600 µl Lysepuffer verwandt. Das Lysat wurde mittels Qia-Shredder-Säulen (Qiagen) homogenisiert. Das homogenisierte Lysat wurde mit dem gleichen Volumen 70% Ethanol (350µl oder 600µl) versetzt und mit der Pipette gemischt. Diese Mischung wurde auf die RNeasy mini spin Säule gegeben und in ein 2 ml Eppendorfcup 15 sek abzentrifugiert. Um DNA-Verunreinigungen zu minimieren, wurde das Isolierungsprotokoll mit einem 30 minütigen DNase-Verdau ergänzt (RNase-free DNase Set, Qiagen). Nach Ablauf der Inkubationszeit der DNase-Reaktion wurde die Säule mit 350 ml RW1 Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Säule noch zweimal mit RPE Puffer gewaschen und dann die RNA mit RNasefreiem Wasser aus der Säule eluiert. Die RNA wurde bei -80°C aliquotiert gelagert, um wiederholtes Auf tauen zu vermeiden.

2.5.3. RNA-Konzentrationsbestimmung

2.5.3.1. Ethidiumbromidplatten

Die RNA-Konzentrationen wurden mit Ethidiumbromid-Platten bestimmt. Die Platten enthielten 1 % Agarose, versetzt mit 1 µg/ml Ethidiumbromid. Je 1 µl der zu bestimmenden RNA-Lösung wurde aufgetragen und die Fluoreszenzstärke unter UV-Licht mit den Fluoreszenzstärken der aufgetragenen RNA-Standard-Verdünnungen (12,5; 25; 50; 100; 200 ng/µl) verglichen. Durch den Vergleich der Intensitäten konnte die unbekannte Konzentration der Probe abgeschätzt werden.

2.5.3.2. RiboGreen[™] RNA Quantitation Kit

Zur exakten Konzentrationsbestimmung der RNA für die RT-PCR und cDNA-Arrays wurde der RiboGreen[™] RNA Quantifizierungs Kit verwendet. Der Fluoreszenzfarbstoff RiboGreen lagerte sich an die RNA an. Die der RNA-Menge proportionale Fluoreszenz wurde dann in einem Spectra Fluor Plus Photometer

Material und Methoden

bestimmt und die RNA-Konzentrationen wurden anschließend mit Hilfe der Magellan Software ermittelt.

2.5.4. RT-PCR

Um die Transkription eines Genes nachzuweisen, muss die abgelesene RNA untersucht werden. Bei der Amplifikation von DNA mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden spezifische DNA-Polymerasen verwendet, welche DNA abhängig sind, d. h. sie sind nicht in der Lage, RNA zu amplifizieren. Daher wurde zuerst eine Reverse Transkriptase (RT) eingesetzt, eine RNA abhängige DNA-Polymerase, mit deren Hilfe RNA in cDNA umgeschrieben werden konnte. Die cDNA konnte im Anschluss als Ausgangsprodukt in einer PCR verwendet werden, um spezifische Sequenzen aus dieser zu amplifizieren.

Für die RT-PCR wurde der 1st Strand cDNA Synthesis-Kit mit AMV reverser Transkriptase verwendet. Die verwendete RNA wurde vorab 5 min bei 95°C denaturiert. Der Reaktionsansatz wurde in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäßen auf Eis hergestellt:

Tabelle 37:

Menge	Reagenzien
2 µl	10x RT-Puffer
4 µl	25 mM MgCl ₂
2 µl	10 mM dNTP
2 µl	Random Hexamers p(dN)6
0,8 µl	AMV Reverse Transkriptase
1 µl	RNase Inhibitor (40 U/µl)
x µl	RNA (50-500 ng)
auf 20 µl auffüllen	H ₂ O bidest

Material und Methoden

Die cDNA-Synthese erfolgte unter folgenden Bedingungen:

25°C	10 min	Binden der Oligonukleotide an die RNA
42°C	60 min	Überschreiben der RNA in cDNA
68°C	15 min	Inaktivierung der Reversen Transkriptase

Alternativ wurde für die RT-PCR statt des Random Primers entweder der forward oder der reverse Primer der gesuchten m-RNA verwendet (p33ING oder IL-6).

2.5.5. cDNA-Array

cDNA-Arrays ermöglichen die Analyse der Genexpressionsmuster von hunderten cDNAs in einem Versuch. Die Firma Clontech bietet mehrere AtlasTM cDNA Expressionsarrays mit verschiedenen Kategorien von Genen auf Nylonmembranen an. Die Länge der gebundenen Fragmente liegt zwischen 200–500 Bp und schließt Poly-A Regionen, repetitive Elemente und hoch homologe Segmente aus. Zur Bestimmung der Genexpression in synovialen Fibroblasten wurden cDNA-Arrays mit humanen cDNAs von 200 Zytokinen und 190 Onkogenen/Tumor-Suppressor-Genen verwendet. Jedes Gen ist auf der Membran doppelt vorhanden. Nur Signale, die in beiden Feldern (Spots) erschienen, wurden ausgewertet.

2.5.5.1. Puffer und Lösungen

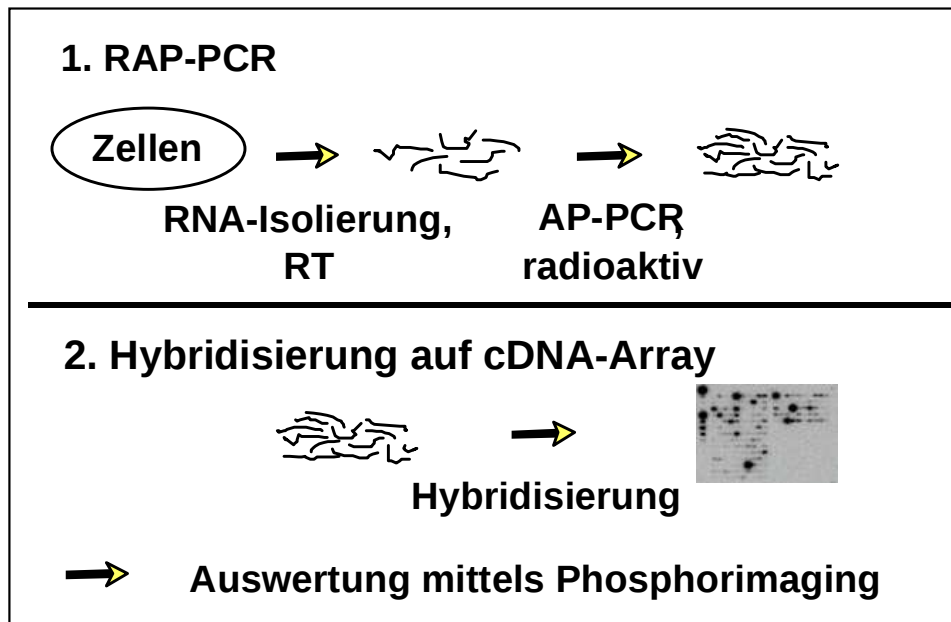
Denaturierungslösung:	1 M NaOH, 10 mM EDTA
Neutralisierungslösung:	1 M NaH ₂ PO ₄ , pH 7,0
20x SSC-Puffer:	3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0
Waschlösung I:	2x SSC, 1 % SDS
Waschlösung II:	0,1x SSC, 0,5 % SDS

2.5.5.2. Herstellung der Hybridisierungsprobe

Zur Herstellung der Hybridisierungsprobe wurde gesamt-RNA von synovialen Fibroblasten mittels RAP-PCR generiert (Abbildung 16).

Material und Methoden

Abbildung 16: Schematische Darstellung der Kombination von RAP-PCR und cDNA-Array



Für die RAP-PCR wurden die folgenden Ansätze verwendet.

Ansatz der RT für die RAP-PCR:

Tabelle 38:

Menge	Reagenzien
1 µl	10x RT-Puffer
1 µl	100 mM DTT
0,2 µl	10 mM dNTP
0,8 µl	Primermix (OPN 23)
0,1 µl	MLV Reverse Transkriptase
0,5 µl	RNAse Inhibitor (40 U/µl)
5 µl	RNA (250-500 ng)
1,4 µl	H ₂ O bidest

Im Anschluß an die RT-PCR wurde folgender Mix zur radioaktiven Markierung der RAP-PCR-Produkte verwendet

Material und Methoden

Ansatz für die RAP-PCR:

Tabelle 39:

Menge	Reagenzien
2 µl	10x Taq-Stoffel
3,2 µl	25 mM MgCl ₂
0,8 µl	10 mM dNTP (ohne dATP)
0,8 µl	Primer (OPN 21)
0,4 µl	Taq-Stoffel
2,8 µl	[alpha- ³² P]dATP
10 µl	RT für RAP-PCR
auf 20 µl auffüllen	H ₂ O bidest

2.5.5.3. Säulenaufreinigung

Die Reaktionen wurden von nicht eingebauten Nukleotiden und kleinen DNA-Fragmenten (< 0,1 kb) gereinigt. Hierzu wurde der NucleoSpin[®]-Kit, der dem Atlas[™] cDNA Expressions Array-Kit beiliegt, nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Hybridisierungsprobe lag am Ende der Aufreinigung in 100 µl Elutionspuffer vor.

2.5.5.4. Hybridisierung

Zunächst wurden die Membranen mit Hybridisierungslösung (ExpressHyb, Clontech), versetzt mit 0,1 mg/ml denaturierter Salmon-Testes-DNA (10 min 95°C), in einer kleinen Hybridisierungsflasche zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen prähybridisiert. Hierzu wurden 6 ml vorgewärmter Hybridisierungslösung zu den Membranen gegeben und für mindestens 30 min bei 68°C im Hybridisierungssofen inkubiert.

Parallel zu der Prähybridisierung der Membranen wurde die Hybridisierungsprobe denaturiert. Die aufgereinigte Sonde wurde mit 1/10 Volumen Denaturierungslösung versetzt und 20 min bei 68°C inkubiert. Die nachfolgende Neutralisierung erfolgte durch Zugabe von 5 µl C₀t-1 DNA und 1 Volumen Neutralisierungslösung für 10 min bei 68°C. Sobald die Denaturierung der Proben beendet war, wurde die gereinigte, denaturierte Hybridisierungsprobe zu den prähybridisierten Membranen und der Prähybridisierungslösung gegeben und über Nacht bei 68°C hybridisiert.

Material und Methoden

2.5.5.5. Waschen

Nach der Hybridisierung erfolgten mehrere Waschschriffe, um ungebundene Sonden zu entfernen. Es wurde 3x für jeweils 15 min bei 68°C mit Waschlösung I gewaschen, anschließend 1-2x mit Waschlösung II, je nach Reststrahlung der Membranen nach den Waschschriffen mit Lösung I. Die SDS-Rückstände der Waschpuffer wurden durch Schwenken und kurzes Inkubieren bei Raumtemperatur in 2x SSC-Puffer entfernt. Abschließend wurden die Membranen in Plastikfolie unter Luftausschluß eingeschweißt, um ein Austrocknen zu verhindern.

2.5.5.6. Phosphorimaging

Die Membranen wurden 3-5 Tage auf einen Phosphorimager-Screen aufgelegt, um die Hybridisierungssignale sichtbar zu machen. Die Auswertung erfolgte mittels eines Phosphorimagers. Das erzeugte Bild konnte mittels ImageQuant Software (Molecular Dynamics, Freiburg) bearbeitet werden. Die Auswertung erfolgte dann mittels Atlas™ 2.0 Software.

2.5.5.7. Auswertung mittels der Atlas™ 2.0 Software

Die Atlas™ 2.0 Software wurde speziell für die Auswertung von Atlas™ cDNA Expressions Arrays von Clontech entwickelt. Prinzipiell wird hierbei über die Phosphorimager-Datei zunächst ein Array-spezifisches Gitter gelegt und die Hybridisierungssignale werden an das Arraygitter angepaßt. Anschließend wird automatisch für jedes Hybridisierungssignal eine Intensität berechnet, die auf konstant in Zellen exprimierte Gene oder global normalisiert wird. Die einzelnen Arrays können dann miteinander verglichen werden und die differentiellen Intensitäten, die den differentiell exprimierten Genen entsprechen, von der Software dargestellt werden.

Array-„Alignment“: Zunächst wurde der entsprechende Array ausgewählt. Über zwei manuell definierte Orientierungspunkte wurde dann die Lage der Membran im Bild definiert, wodurch die Software ein Gitter mit eng eingegrenzten Feldern pro gebundene cDNA-Region („Spot“) über die Membran entsprechend der Lage der gebundenen cDNA legen konnte. Das Gitter besteht pro cDNA aus zwei Feldern (doppelt gespottet), welche die Region der gebundenen cDNA an die Membran genau umgrenzen. Als Ansichtsoption wurde die logarithmische Skalierung gewählt,

Material und Methoden

wodurch auch die Detektion von schwachen Signalen auf den Arrays ermöglicht wurde. Anschließend erfolgte eine automatische Anpassung („auto-alignment“) der Spots mit den Hybridisierungssignalen. Die endgültige Feineinstellung der Spots erfolgte dann manuell. Gene, die von benachbarten, stark exprimierten Genen überlagert wurden, konnten manuell aus der Auswertung ausgeschlossen werden, ebenso wie Gene, deren zwei Hybridisierungsintensitäten stark unterschiedlich waren. Sobald das Gitter exakt auf den Hybridisierungssignalen lag, wurden die Arrays abgespeichert und konnten nun mit anderen Arrays verglichen werden. Die Intensität der einzelnen Gene eines Arrays wird aus dem Mittelwert des rechten und linken Spots errechnet.

Arrayvergleich und Report: Zunächst wurden die zwei zu vergleichenden Arrays geöffnet und in der Vergleichsansicht der Software („comparison view“) dargestellt. Hierbei können die einzelnen Arrays sowie die Vergleichsansicht ausgewählt werden. Die Arrays wurden dann mit Hilfe der sogenannten globalen Normalisierung auf ein gleiches Intensitätsniveau gebracht. Hierbei wurde der Signalwert jedes einzelnen Genes auf dem Array zur Normalisierung herangezogen. Dadurch entfällt der Abgleich auf konstant in Zellen exprimierte Gene, die sich oft als nicht exakt konstant exprimiert herausgestellt hatten. Die abgeglichenen Werte errechneten sich aus den Intensitäten, abzüglich der Hintergrundwerte jedes Arrays, multipliziert mit dem Normalisierungskoeffizienten, der durch die Summenmethode (Default) der Software ermittelt wird (Neumann 2001).

2.5.5.8. Strippen der Membranen

Zur mehrfachen Verwendung der Membranen mußte die gebundene Sonde nach Auswertung einer Hybridisierung entfernt werden. Hierfür wurden die Membranen 10 min bei 95°C in 0,5 % SDS unter permanentem Schüttelein inkubiert. Nach 10 min Abkühlung wurden die Membranen in 2x SSC geschwenkt und in Plastikfolie eingeschweißt, um ein Austrocknen der Membran zu verhindern. Die Lagerung der gestripten Membranen erfolgte bei –20°C.

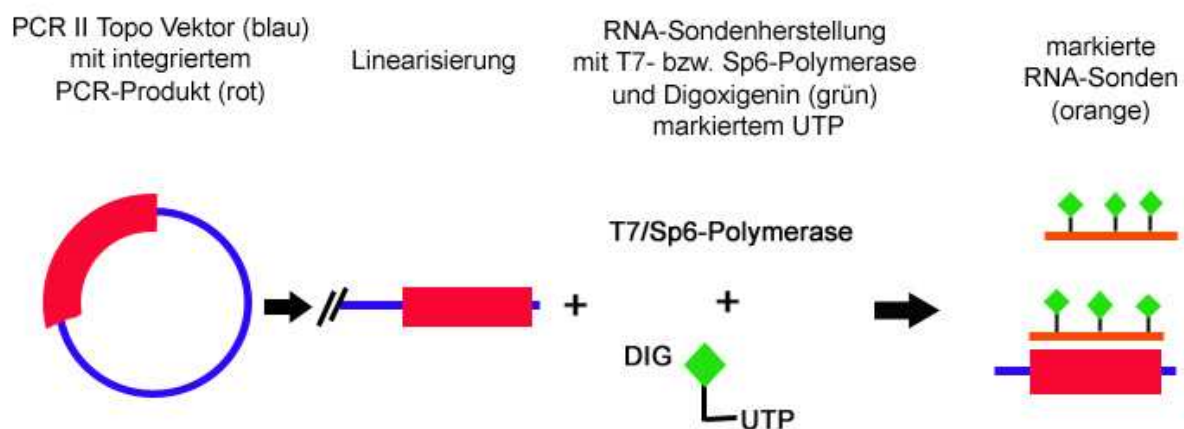
Material und Methoden

2.5.6. Digoxigenin-AP-AK-Färbung zum Nachweis der markierten RNA-Sonden

2.5.6.1. Herstellung der markierten RNA-Sonden für die Transfektion

Zur Überprüfung der Inkorporation der transfizierten RNA in die Zellen wurden markierte RNA-Sonden hergestellt. Hierzu wurden zunächst IL-6- oder p33ING-PCR-Produkte mittels Topo-Cloning in den PCR II-Topo-Vektor kloniert (siehe 2.2.17). Dieser Vektor enthält die Promotoren für die SP6 bzw. T7-RNA-Polymerasen. Dadurch kann die direkte Transkription von RNA-Sonden aus dem Vektor erfolgen (siehe Punkt 2.3.). Alle verwendeten Konstrukte wurden mittels Sequenzierung überprüft. Die Linearisierung und Transkription erfolgte wie in Punkt 2.3. beschrieben mit dem MaxiScript™ Kit der Fa. Ambion nach den Angaben des Herstellers. Die Sonden wurden durch Zugabe von Digoxigenin-markiertem UTP markiert (1/3 markiertes UTP, 2/3 unmarkiertes UTP) (Abbildung 17).

Abbildung 17: Prinzip der Herstellung der Digoxigenin markierten RNA-Sonden



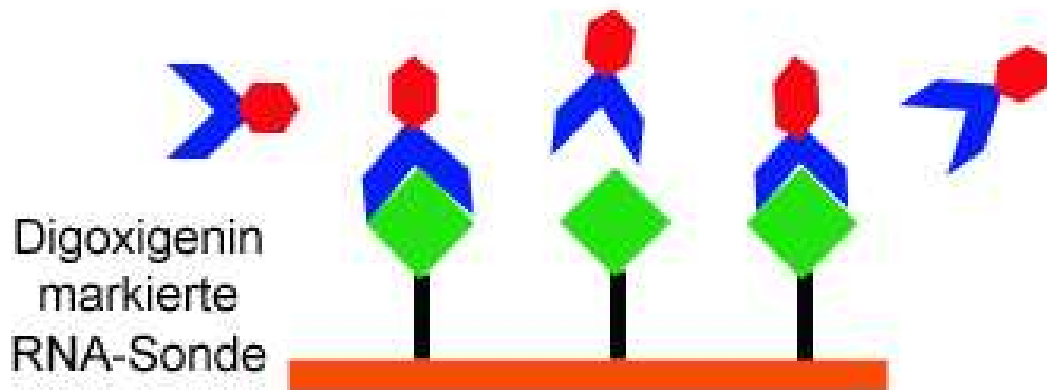
2.5.6.2. Immunhistologischer Nachweis

Der Nachweis, der in die Zellen aufgenommenen Sonden, erfolgte immunhistochemisch unter Verwendung von anti-Digoxigenin-Antikörpern. Dieser Ak besteht nur aus einem Fab-Fragment gegen Digoxigenin, welches an alkalische Phosphatase gekoppelt ist, wodurch das Risiko einer unspezifischen Bindung des Fc-Teils eines Ak an Fc-Rezeptoren vermieden wird (Abbildung 18).

Material und Methoden

Abbildung 18: Anti-Digoxigenin-Antikörper

Anti-Digoxigenin-Antikörper:
Alkalische Phosphatase (rot) gebunden
an ein Fab-Fragment (blau)



Die transfizierten Zellen in den Wells wurden mit PBS gewaschen. Anschließend 15 min fixiert (200µl Reagens A). Nach einem erneuten Waschschriff mit PBS wurden die Zellen mit Reagens B permeabilisiert und mit Anti-Digoxigenin-Antikörper versetzt (750µl/well einer Mischung aus 4,5ml Reagens B + 9µl AK). Die Wells wurden eine Stunde unter Schütteln inkubiert, wieder mit PBS gewaschen und mit Tris-Puffer pH 9,7 für 20 min versetzt. Nach Absaugen desselben, wurde die Färbelösung zugegeben. Die Farbentwicklung erfolgte mit NBT/BCIP im Dunkeln für 30 bis 240 min. Die Alkalische Phosphatase oxidiert BCIP und reduziert NBT. Die Reaktionsprodukte formen ein unlösliches braunes bis blaues Präzipitat. Die Reaktion wurde mit PBS gestoppt.

Anschließend wurden die Wells unter dem Mikroskop beurteilt und abfotografiert.

2.5.7. Transfektionen mit FuGENE™, superFect™ und Effectene™ und GFP-Plasmiden

Die Transfektionen wurden wie im Punkt 2.4. beschrieben mit den einzelnen Reagenzien und verschiedenen

- Verhältnissen von Reagens- zu GFP-Plasmidmenge
- Zelldichten bei Transfektion
- Inkubationszeiten

durchgeführt.

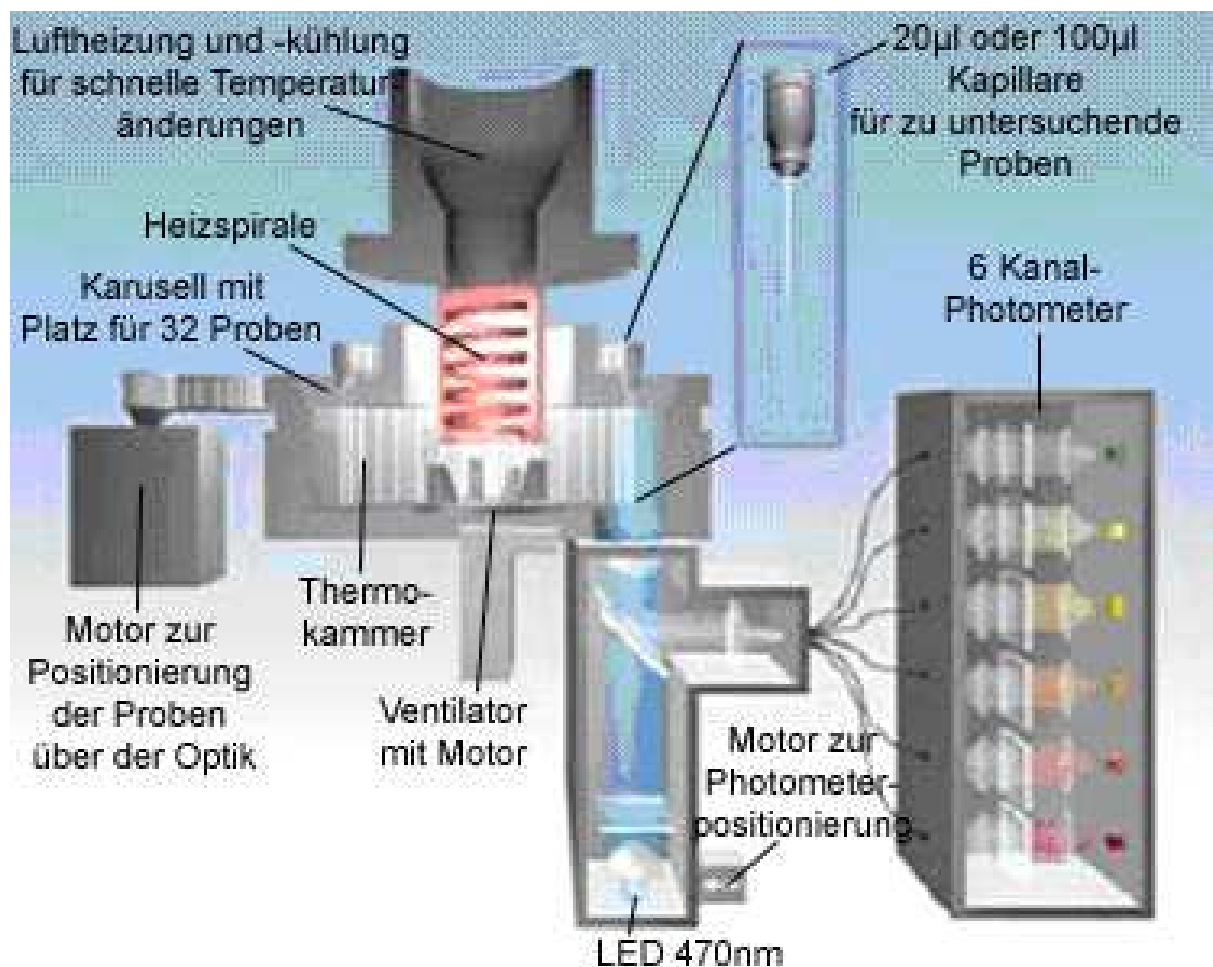
Material und Methoden

Die Transfektionen wurden mit dem GFP-Plasmid (Green fluorescence plasmid) durchgeführt. Nach Abschluß der Transfektion wurden die transfizierten Zellen abtrypsinisiert und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Von der verbleibenden Zellsuspension wurde ein Tropfen auf einen Objektträger gegeben und unter dem Fluoreszenz-Mikroskop betrachtet. Ein direktes Betrachten im Well war aufgrund der Konstruktion des Fluoreszenz-Mikroskopes nicht möglich. In der betrachteten Zellsuspension wurde der Anteil der grün leuchtenden und damit transfizierten Zellen bestimmt und fotografisch dokumentiert.

2.5.8. Quantifizierung mittels Roche LightCycler

Mittels LightCycler (Roche) besteht die Möglichkeit einer Quantifizierung von rapid PCR-Produkten durch Markierung der Doppelstrang-DNA mit SYBR Green-Fluoreszenzfarbstoff und Analyse durch ein integriertes Photometer (Abbildung 19).

Abbildung 19: Querschnitt durch das Light Cycler® 2.0 Instrument



Material und Methoden

Durch den Einsatz dünner Glaskapillaren ist sowohl die Durchführung einer rapid-PCR als auch eine photometrische Messung möglich. Das mitgelieferte Softwareprogramm ermöglicht eine Übertragung und Aufzeichnung der technischen Daten und der gemessenen Fluoreszenz der Proben. SybrGreen fluoresziert, wenn es an dsDNA gebunden ist. Die Messung erfolgt am Ende des Amplifikationsschritts. Die Entstehung des PCR-Produktes wird in drei Phasen unterteilt: anfangs befindet sich die PCR in einer sogenannten lag-Phase, in der das vom PCR-Produkt erzeugte Fluoreszenzsignal kleiner als das sogenannte „Hintergrundrauschen“ ist. Anschließend folgt die log-Phase, in der die DNA exponentiell vervielfältigt wird bis zum Schluss eine Plateauphase erreicht wird, in der die Menge des PCR-Produkts nicht weiter zunimmt. Von der entstandenen Produktmenge kann auf die eingesetzte DNA-Menge geschlossen werden, falls die Effizienz konstant bleibt. Diese Forderung ist jedoch nur während der Log-Phase erfüllt. Beim Übergang in die Plateauphase nimmt die Effizienz ab, eine Quantifizierung ist hier nicht mehr möglich. Die Zahl der Zyklen, nach denen die PCR in die Plateauphase übergeht, ist abhängig von der DNA-Konzentration und der Menge der PCR-Reagenzien. Die Zyklen-Zahl, in denen sich die PCR in der log-Phase befindet, wird auf 4-10 Zyklen geschätzt (Jung et al. 2000, Rasmussen 2001).

Folgender Ansatz für die rapid-PCR wurde gewählt:

Tabelle 40:

Menge	Reagenzien
2 µl	Mastermix (Enzym, Puffer, SYBR-Green)
1,6 µl	3 mM MgCl ₂
2 µl	forward-Primer
2 µl	reverse-Primer
2 µl	cDNA
10,4 µl	H ₂ O bidest

Material und Methoden

Der PCR-Ansatz wurde in die vorgekühlten, im Kühlblock stehenden Glaskapillaren pipettiert. Die cDNA wurde als letztes hinzugefügt. Nach Zentrifugation und Einsetzen in das LightCycler-Karusell, wurde folgendes Programm gestartet.

Initiale Denaturierung bei 95°C für 10 min

rapid PCR-Amplifikation: wiederholte Zyklen von „denaturation“ a 5 sec bei 95°C, „annealing“ a 5 sec bei 54°C und „elongation“ a 25 sec bei 72°C.

Erstellung einer Schmelzkurve

Kühlung des Systems

Die Schmelztemperatur der entstandenen PCR Produkte wurde mit Hilfe einer Schmelzkurvenanalyse ausgewertet. Dieser liegt eine Bewertung der Fluoreszenzintensität in Bezug zur Temperatur zugrunde. Mit steigender Temperatur sinkt die Intensität des Fluoreszenzfarbstoffes aufgrund abnehmender Doppelstrang-DNA und dadurch zunehmender Menge an ungebundenem SybrGreen. Überschreitet die Temperatur die Schmelztemperatur der PCR-Produkte, so kommt es zu einem starken Abfall der Fluoreszenz-Intensität. Damit ergibt sich aus der negativen ersten Ableitung der Schmelzkurve bei T_M (Schmelzpunkt) ein Maximum. Dieses Maximum entspricht der Temperatur, zu der die Hälfte der entstandenen Produkte geschmolzen ist. Es ist abhängig von der Sequenz der PCR-Produkte. Damit können gewünschte von ungewünschten PCR-Produkten, wie z.B. Primer-Dimere, unterschieden werden.

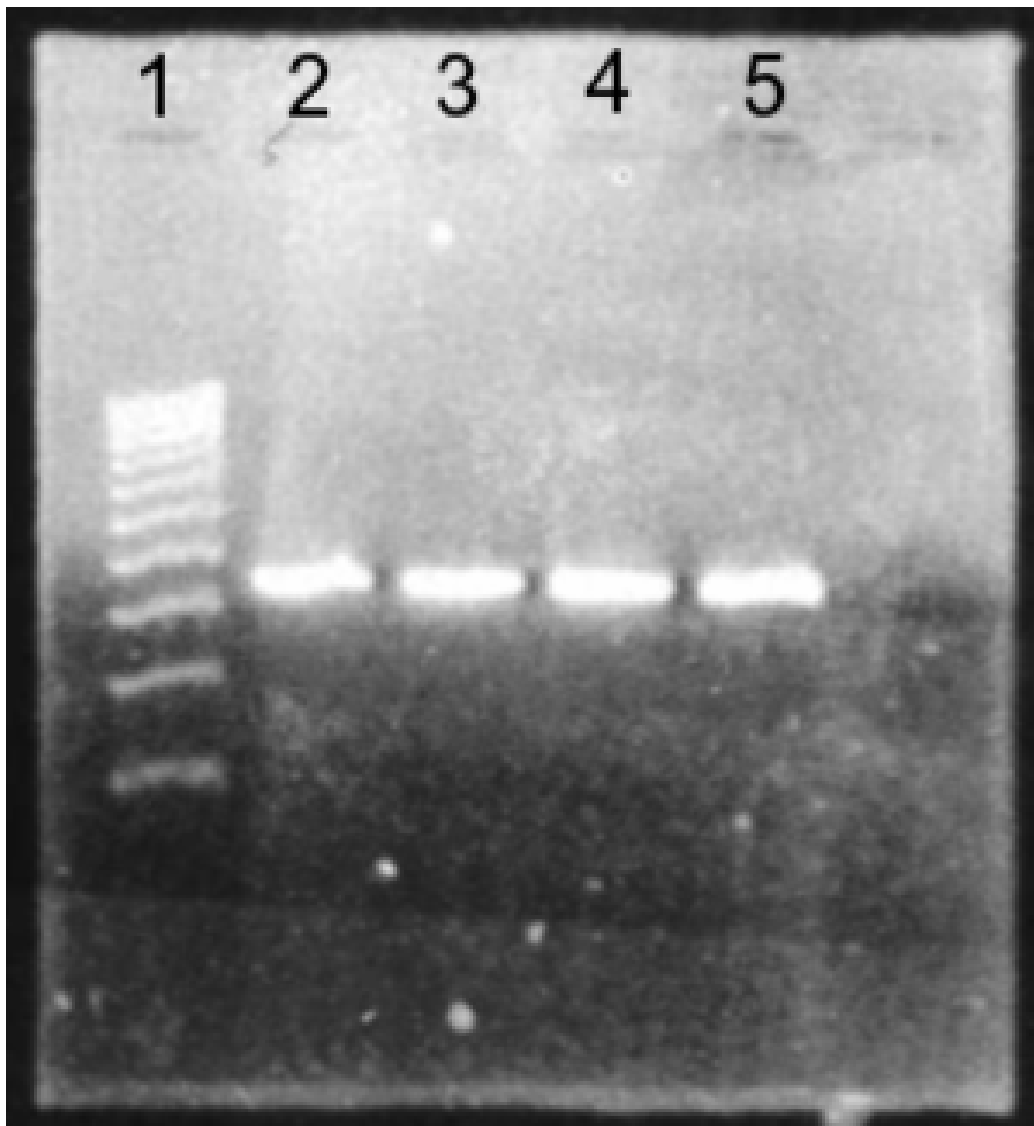
IV. ERGEBNISSE

1. Ergebnisse der Plasmidherstellung

1.1. Ergebnis der PCR

In der gemäß Methoden 2.2.2 durchgeführten PCR, wurde nach Auftrag auf 2%iges Agarosegel und elektrophoretischer Auftrennung folgendes Ergebnis für die PCR mit IL-6 Primern und cDNA von Fibroblasten von Rheumapatienten (RA1-4) erzielt (Abbildung 20):

Abbildung 20: Ergebnis der PCR mit IL-6 Primern



Bildindex:

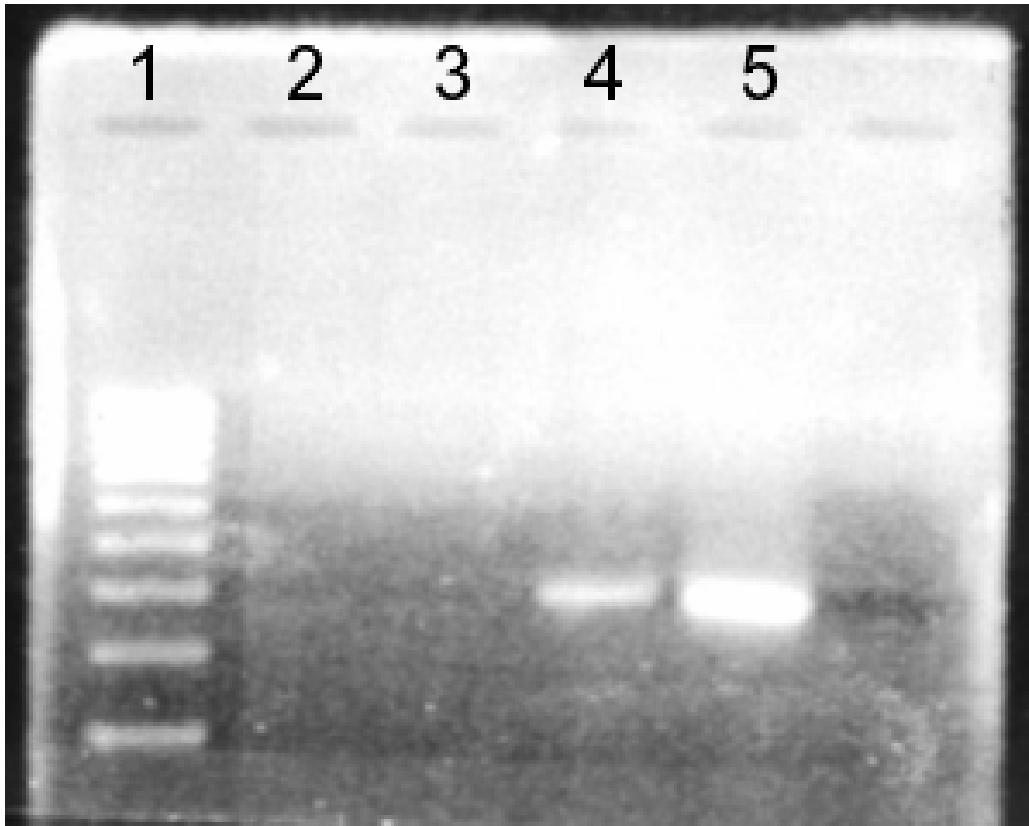
Geltasche 1: 1 Kilobasenpaarmarker in 100 Basenpaar (bp) -Schritten

Geltasche 2-5: PCR-Produkte von 4 verschiedenen RA-cDNA-Proben

Ergebnisse

Die PCR mit p33ING1-Primern wurde mit cDNA von Normalhautfibroblasten durchgeführt und erbrachte folgendes Ergebnis (Abbildung 21):

Abbildung 21: Ergebnis der PCR mit p33ING1-Primern



Bildindex:

Geltasche 1: Kilobasenpaarmarker in 100 bp -Schritten

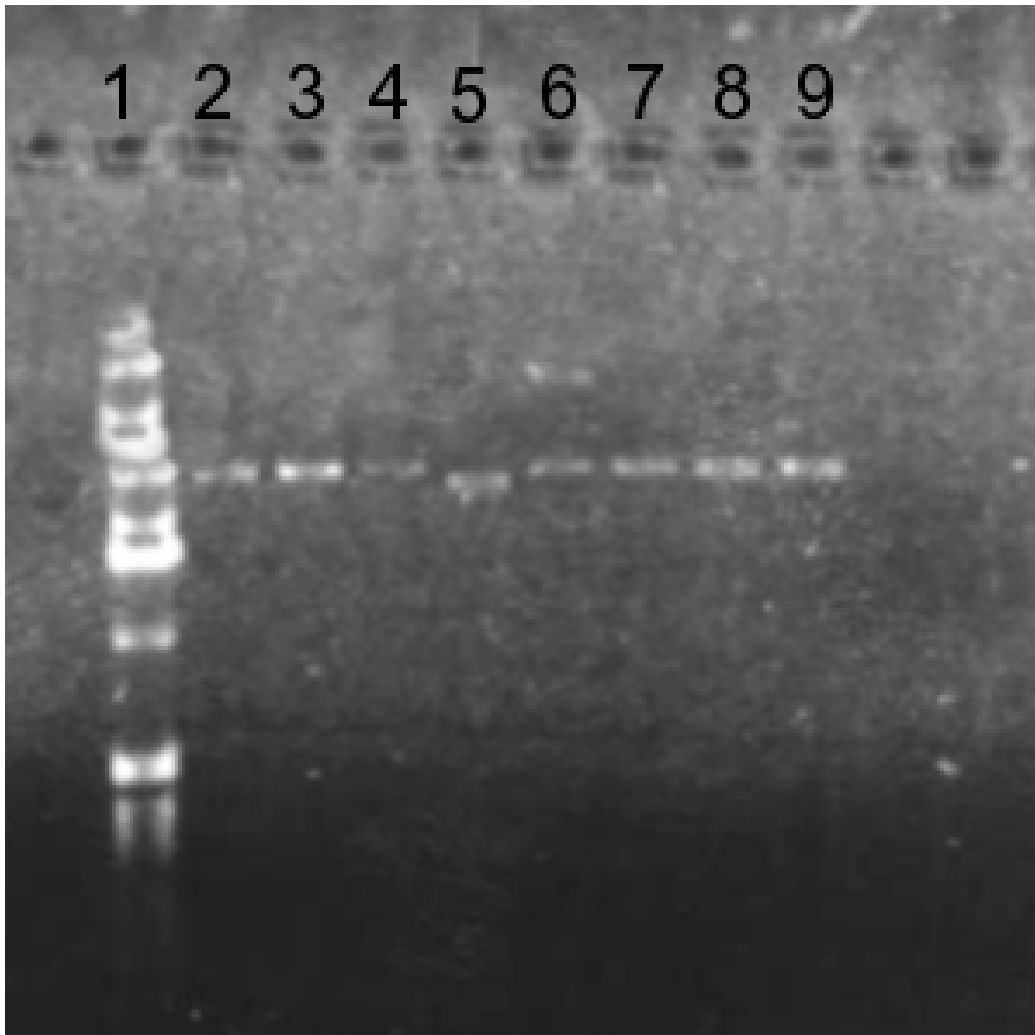
Geltasche 4-5: PCR-Produkte von NHDF-c-cDNA

1.2. Ergebnis der Plasmidisolierung

Nachdem die im Nachweis positiven PCR-Produkte (elektrophoretischer Nachweis in der erwarteten Basenpaarlänge), wie im Methodenteil beschrieben, in die Plasmide integriert, und die passenden (nicht blau verfärbten) Bakterienkolonien in Flüssigkulturen vervielfältigt wurden, wurden die Plasmide, wie in Methoden 2.2.5. beschrieben, isoliert und elektrophoretisch auf Agarosegel aufgetrennt (Abbildung 22).

Ergebnisse

Abbildung 22: Ergebnis der Plasmidisolierung



Bildindex:

Geltasche 1: 1 Kilobasenpaarmarker in 100 bp-Schritten

Geltasche 2: isolierte Plasmide der Flüssigkultur der 2. Bakterienkolonie auf der Agarplatte (weiß), in die PCR-Produkte der p33ING1 Primer-PCR integriert wurden (kurz p33ING-2)

Geltasche 3: isoliertes Plasmid der Flüssigkultur der 4. Bakterienkolonie auf der Agarplatte (weiß), in die PCR-Produkte der p33ING1 Primer-PCR integriert wurden (kurz p33ING-4)

Geltasche 4: isoliertes Plasmid der Flüssigkultur der 6. Bakterienkolonie auf der Agarplatte (weiß), in die PCR-Produkte der p33ING1 Primer-PCR integriert wurden (kurz p33ING-6)

Geltasche 5: isoliertes Plasmid der Flüssigkultur der 12. Bakterienkolonie auf der Agarplatte (blau), in die PCR-Produkte der p33ING1 Primer-PCR nicht integriert wurden (kurz p33ING-12 = Negativkontrolle)

Geltasche 6: isoliertes Plasmid der Flüssigkultur der 2. Bakterienkolonie auf der Agarplatte (weiß), in die PCR-Produkte der IL-6 Primer-PCR integriert wurden (kurz IL-6-2)

Geltasche 7: isoliertes Plasmid der Flüssigkultur der 4. Bakterienkolonie auf der Agarplatte (weiß), in die PCR-Produkte der IL-6 Primer-PCR integriert wurden (kurz IL-6-4)

Geltasche 8: isoliertes Plasmid der Flüssigkultur der 6. Bakterienkolonie auf der Agarplatte (weiß), in die PCR-Produkte der IL-6 Primer-PCR integriert wurden (kurz IL-6-6)

Geltasche 9: isoliertes Plasmid der Flüssigkultur der 12. Bakterienkolonie auf der Agarplatte (blau), in die PCR-Produkte der IL-6 Primer-PCR nicht integriert wurden (kurz IL-6-12 = Negativkontrolle)

Ergebnisse

1.3. Ergebnis des Plasmidverdau

Beim Verdau der isolierten Plasmide mit dem Enzym EcoR1, wie in Methoden 2.2.6 beschrieben, ergab sich folgendes Ergebnis bei der gelelektrophoretischen Auftrennung (Abbildung 23):

Abbildung 23: Ergebnis des Plasmidverdau mit EcoR1



Bildindex:

Geltasche 1: 10 Kilobasenpaarmarker in 1000 bp-Schritten

Geltasche 3: Plasmidverdau von p33ING-2

Geltasche 4: Plasmidverdau von p33ING-4

Geltasche 5: Plasmidverdau von p33ING-6

Geltasche 6: Plasmidverdau von Negativkontrolle

Geltasche 8: Plasmidverdau von IL-6-2

Geltasche 9: Plasmidverdau von IL-6-4

Geltasche 10: Plasmidverdau von IL-6-6

Geltasche 11: Plasmidverdau von Negativkontrolle

Geltasche 13: 1 Kilobasenpaarmarker in 100 bp-Schritten

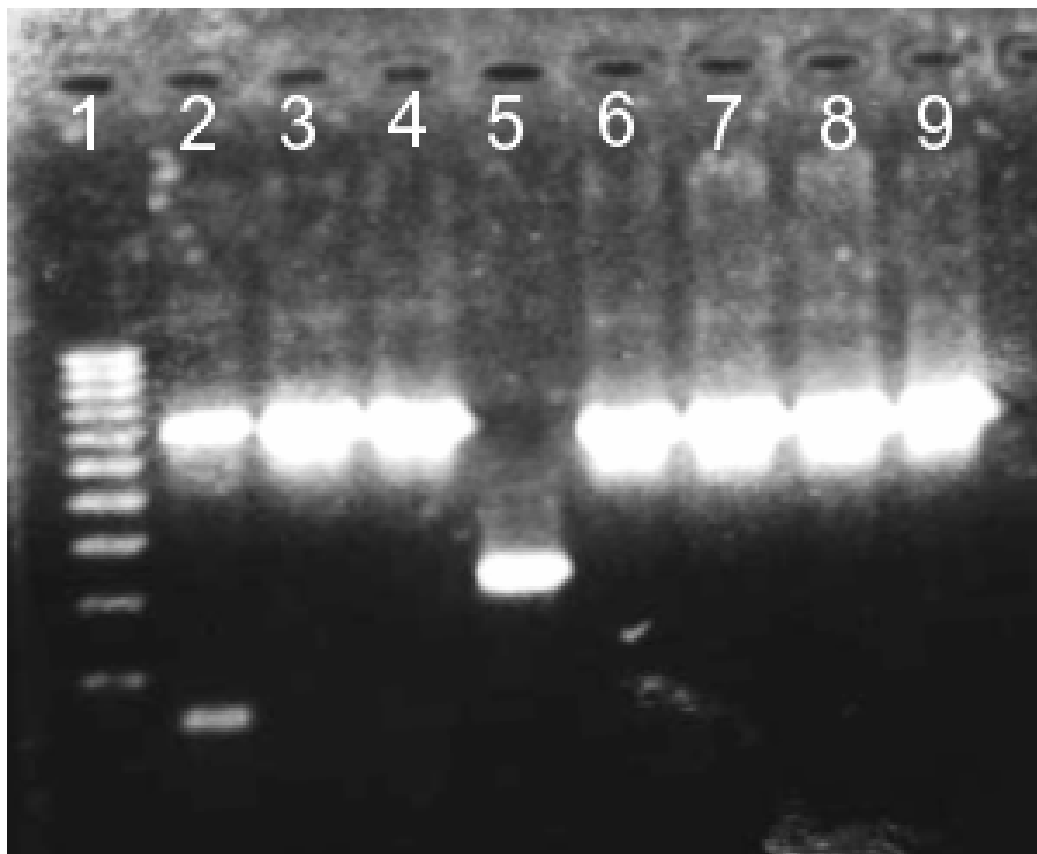
Ergebnisse

Da sich hierbei kein eindeutiger Nachweis der eingebauten PCR-Produkte ergab, schlossen wir eine M13-PCR an.

1.4. Ergebnis der M13-PCR

In der M13-PCR, die wie in Methoden 2.2.7 beschrieben durchgeführt wurde, konnten PCR-Produkte in der erwarteten Basenpaarlänge nachgewiesen werden. In der Negativkontrolle von p33ING fand sich erwartungsgemäß nur ein 230 BP langes Stück. In der Negativkontrolle von IL-6 fand sich ein 570 BP langes Stück, so dass davon ausgegangen werden muß, dass in dieses Plasmid trotz einer Blauverfärbung des Bakteriums das entsprechende PCR-Produkt eingebaut wurde (Abbildung 24).

Abbildung 24: Ergebnis der PCR mit M13-Primern



Bildindex:

Geltasche 1: 1 Kilobasenpaarmarker in 100 bp-Schritten

Geltasche 2: M13-PCR von p33ING-2

Geltasche 3: M13-PCR von p33ING-4

Geltasche 4: M13-PCR von p33ING-6

Geltasche 5: M13-PCR von p33ING-Negativkontrolle

Geltasche 6: M13-PCR von IL-6-2

Geltasche 7: M13-PCR von IL-6-4

Geltasche 8: M13-PCR von IL-6-6

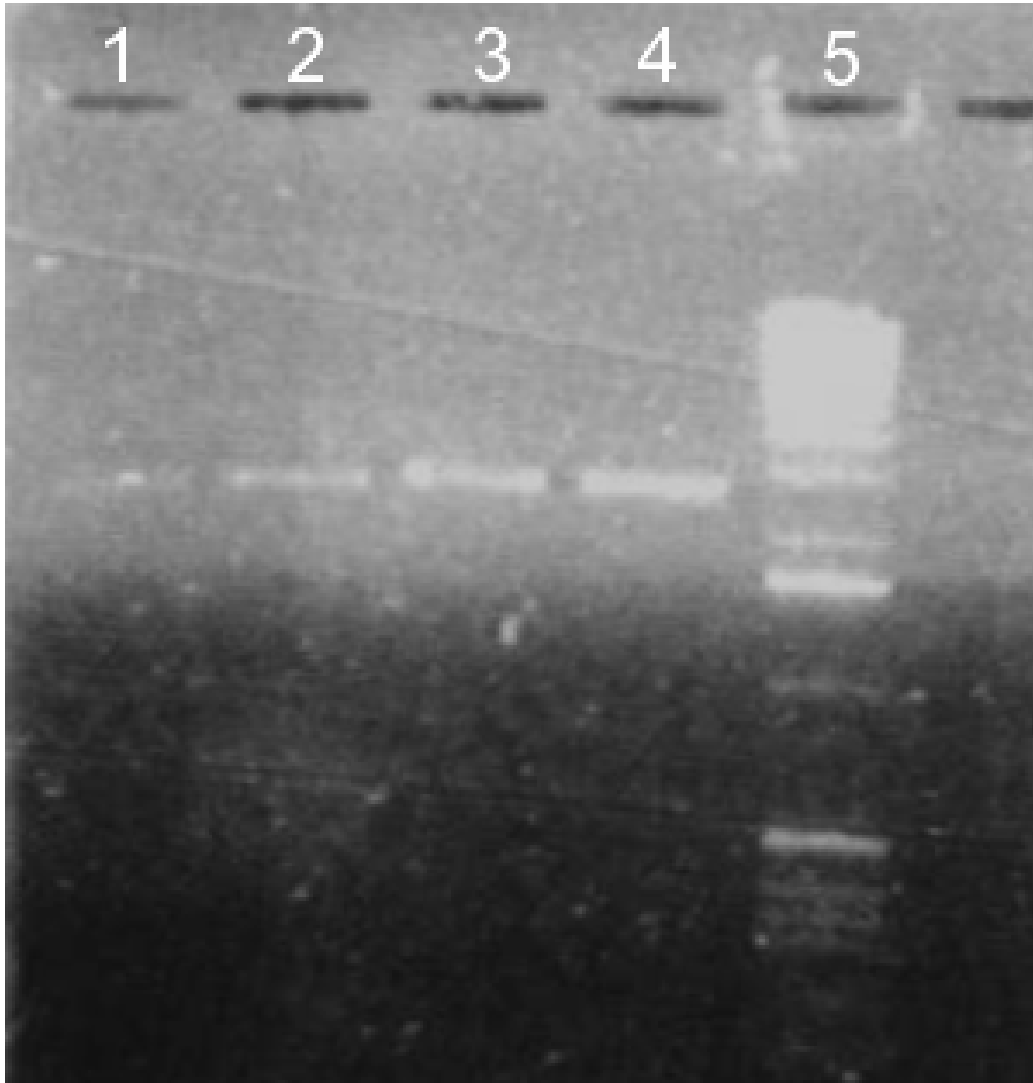
Geltasche 9: M13-PCR von IL-6-Negativkontrolle

Ergebnisse

1.5. Ergebnis der Maxi Plasmid Präparation

Die gemäß Methoden 2.2.8. durchgeführte Maxi Plasmid Präparation erbrachte folgendes Ergebnis (Abbildung 25).

Abbildung 25: Ergebnis der Maxi Plasmid Präparation



Bildindex:

Geltasche 1: Plasmidmaxipräp von IL-6-4

Geltasche 2: Plasmidmaxipräp von IL-6-6

Geltasche 3: Plasmidmaxipräp von p33ING-4

Geltasche 4: Plasmidmaxipräp von p33ING-6

Geltasche 5: 10 Kilobasenpaarmarker in 1000 bp-Schritten

Ein Teil der isolierten Plasmide wurde gefällt und sequenziert, wie in Methoden 2.2.9 und Methoden 2.2.10 beschrieben.

Ergebnis der Sequenzierung:

Plasmid IL-6-4 in Topo-Vektor: 349 von 349 Basen stimmen überein

Plasmid IL-6-6 in Topo-Vektor: 349 von 349 Basen stimmen überein

Plasmid p33ING-4 in Topo-Vektor: 379 von 380 Basen stimmen überein

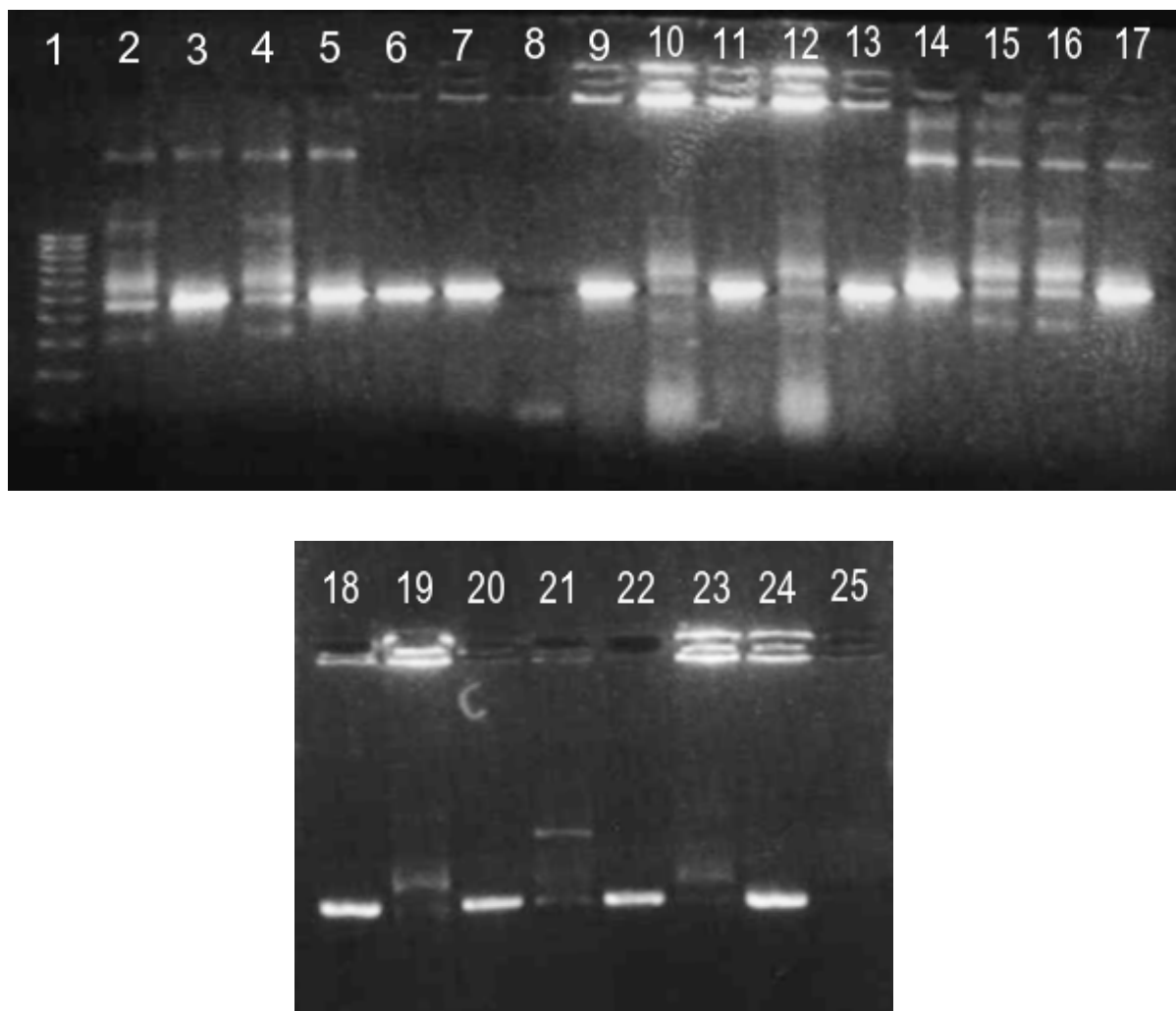
Plasmid p33ING-6 in Topo-Vektor: 380 von 380 Basen stimmen überein

Ergebnisse

1.6. Ergebnis der Testung der Richtung des eingebauten Inserts

Wie in Methoden 2.2.11 beschrieben, wurde eine PCR mit M13-Primer und forward- bzw. reverse-Primer des eingebauten PCR-Produkts durchgeführt. Dies ergab, dass alle IL-6 PCR-Produkte in derselben Richtung eingebaut wurden. Die p33ING-PCR-Produkte wurden in unterschiedlicher Richtung eingebaut, so dass mit p33ING-4 und p33ING-6 Plasmide mit „sense“- und „antisense“-Richtung zu Verfügung standen (Abbildung 26).

Abbildung 26: Ergebnis der PCR mit M13-Primern und for/rev-Primern der eingebauten Produkte



Bildindex:

Geltasche 1: 1 Kilobasenpaarmarker in 100 bp-Schritten

Geltasche 2: PCR mit M13 forward Primer und IL-6 forward Primer und Plasmid IL-6-4

Geltasche 3: PCR mit M13 forward Primer und IL-6 reverse Primer und Plasmid IL-6-4

Geltasche 4: PCR mit M13 forward Primer und IL-6 forward Primer und Plasmid IL-6-6

Geltasche 5: PCR mit M13 forward Primer und IL-6 reverse Primer und Plasmid IL-6-6

Geltasche 6: PCR mit M13 forward Primer und IL-6 forward Primer und der 3. Bakterienkolonie auf der Agarplatte (weiß), in die PCR-Produkte der IL-6 Primer-PCR integriert wurden (kurz IL-6-3)

Geltasche 7: PCR mit M13 forward Primer und IL-6 reverse Primer und der 3. Bakterienkolonie auf der

Ergebnisse

Agarplatte (weiß), in die PCR-Produkte der IL-6 Primer-PCR integriert wurden (kurz IL-6-3)
Geltasche 8: PCR mit M13 forward Primer und IL-6 forward Primer und der 1.Bakterienkolonie auf der Agarplatte (weiß), in die PCR-Produkte der IL-6 Primer-PCR integriert wurden (kurz IL-6-1)
Geltasche 9: PCR mit M13 forward Primer und IL-6 reverse Primer und der 1.Bakterienkolonie auf der Agarplatte (weiß), in die PCR-Produkte der IL-6 Primer-PCR integriert wurden (kurz IL-6-1)
Geltasche10: PCR mit M13 forward Primer und IL-6 forward Primer und der 5.Bakterienkolonie auf der Agarplatte (weiß), in die PCR-Produkte der IL-6 Primer-PCR integriert wurden (kurz IL-6-5)
Geltasche11: PCR mit M13 forward Primer und IL-6 reverse Primer und der 5.Bakterienkolonie auf der Agarplatte (weiß), in die PCR-Produkte der IL-6 Primer-PCR integriert wurden (kurz IL-6-5)
Geltasche12: PCR mit M13 forward Primer und IL-6 forward Primer und der 7.Bakterienkolonie auf der Agarplatte (weiß), in die PCR-Produkte der IL-6 Primer-PCR integriert wurden (kurz IL-6-7)
Geltasche13: PCR mit M13 forward Primer und IL-6 reverse Primer und der 7.Bakterienkolonie auf der Agarplatte (weiß), in die PCR-Produkte der IL-6 Primer-PCR integriert wurden (kurz IL-6-7)
Geltasche14: PCR mit M13 forward Primer und p33ING1 forward Primer und Plasmid p33ING-4
Geltasche15: PCR mit M13 forward Primer und p33ING1 reverse Primer und Plasmid p33ING-4
Geltasche16: PCR mit M13 forward Primer und p33ING1 forward Primer und Plasmid p33ING-6
Geltasche17: PCR mit M13 forward Primer und p33ING1 reverse Primer und Plasmid p33ING-6
Geltasche18: PCR mit M13 forward Primer und p33ING1 forward Primer und der 1.Bakterienkolonie auf der Agarplatte (weiß), in die PCR-Produkte der p33ING1 Primer-PCR integriert wurden (kurz p33ING-1)
Geltasche19: PCR mit M13 forward Primer und p33ING1 reverse Primer und der 1.Bakterienkolonie auf der Agarplatte (weiß), in die PCR-Produkte der p33ING1 Primer-PCR integriert wurden (kurz p33ING-1)
Geltasche20: PCR mit M13 forward Primer und p33ING1 forward Primer und der 3.Bakterienkolonie auf der Agarplatte (weiß), in die PCR-Produkte der p33ING1 Primer-PCR integriert wurden (kurz p33ING-3)
Geltasche21: PCR mit M13 forward Primer und p33ING1 reverse Primer und der 3.Bakterienkolonie auf der Agarplatte (weiß), in die PCR-Produkte der p33ING1 Primer-PCR integriert wurden (kurz p33ING-3)
Geltasche22: PCR mit M13 forward Primer und p33ING1 forward Primer und der 5.Bakterienkolonie auf der Agarplatte (weiß), in die PCR-Produkte der p33ING1 Primer-PCR integriert wurden (kurz p33ING-5)
Geltasche23: PCR mit M13 forward Primer und p33ING1 reverse Primer und der 5.Bakterienkolonie auf der Agarplatte (weiß), in die PCR-Produkte der p33ING1 Primer-PCR integriert wurden (kurz p33ING-5)
Geltasche24: PCR mit M13 forward Primer und p33ING1 forward Primer und der 7.Bakterienkolonie auf der Agarplatte (weiß), in die PCR-Produkte der p33ING1 Primer-PCR integriert wurden (kurz p33ING-7)
Geltasche25: PCR mit M13 forward Primer und p33ING1 reverse Primer und der 7.Bakterienkolonie auf der Agarplatte (weiß), in die PCR-Produkte der p33ING1 Primer-PCR integriert wurden (kurz p33ING-7)

1.7. Ergebnis des Plasmidverdaus zum Einbau in den pcDNA 3.1+ Vektor

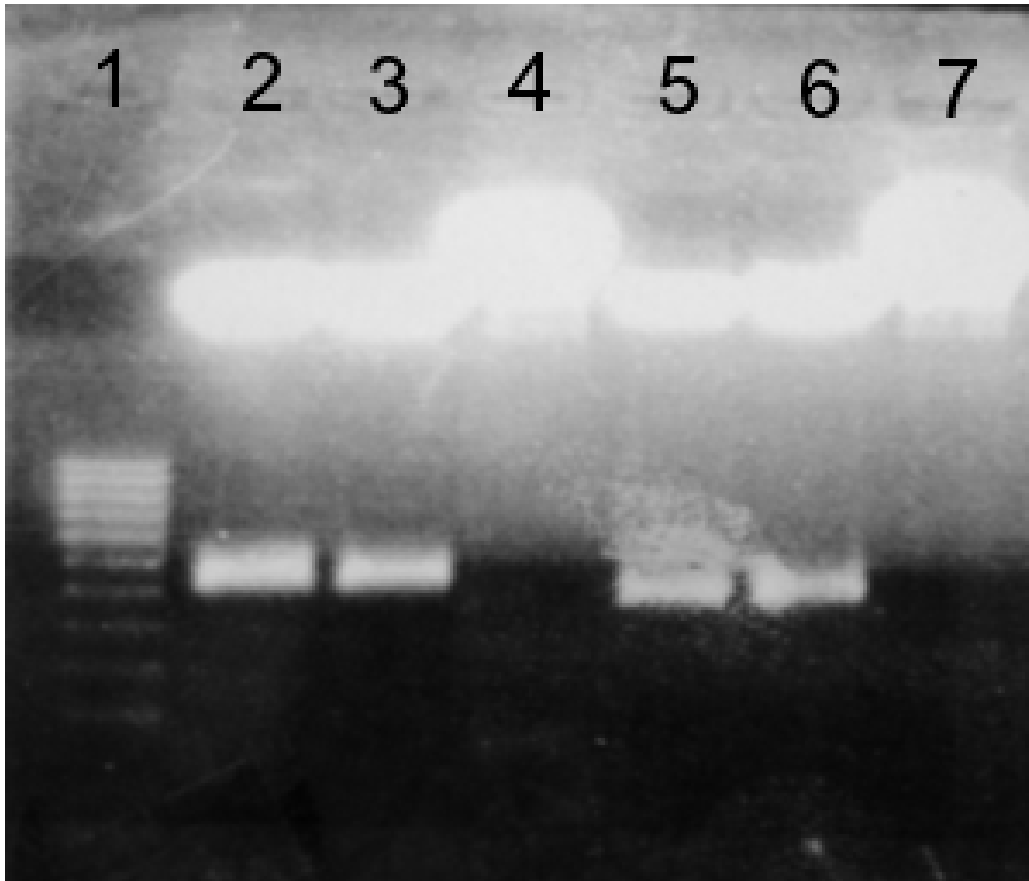
Wie in Methoden 2.2.12 beschrieben, wurden zum Verdau von p33ING Plasmiden und IL-6 Plasmiden zwei unterschiedliche Enzyme benutzt. Das p33ING Plasmid wurde mit 2 unterschiedlichen Enzymen, die jeweils nur eine Schnittstelle in den beiden Vektoren besitzen, verdaut. Ebenso wurde mit dem pcDNA 3.1 Vektor verfahren, so daß es nur eine mögliche Richtung des Insertseinbaus gab, da hier ja schon beide Richtungen vorlagen. Beim IL-6-Plasmid wurde ein Enzym verwendet, das in beiden Vektoren eine Schnittstelle vor und hinter dem eingebauten PCR-

Ergebnisse

Produkt besaß. Damit ergab sich die Möglichkeit, daß das verdaute Stück in zwei unterschiedlichen Richtungen in den neuen pcDNA 3.1. Vektor eingebaut werden konnte.

Hier das Ergebnis der gelelektrophoretischen Auftrennung des Plasmidverdaus (Abbildung 27).

Abbildung 27: Ergebnis des Plasmidverdaus



Bildindex:

Geltasche 1: 1 Kilobasenpaarmarker in 100 bp-Schritten

Geltasche 2: Mit EcoR5 und BamH1 verdautes Plasmid p33ING-4

Geltasche 3: Mit EcoR5 und BamH1 verdautes Plasmid p33ING-6

Geltasche 4: Mit EcoR5 und BamH1 verdauter pcDNA 3.1 + Vektor

Geltasche 5: Mit EcoR1 verdautes Plasmid IL-6-4

Geltasche 6: Mit EcoR1 verdautes Plasmid IL-6-6

Geltasche 7: Mit EcoR1 verdauter pcDNA 3.1 + Vektor

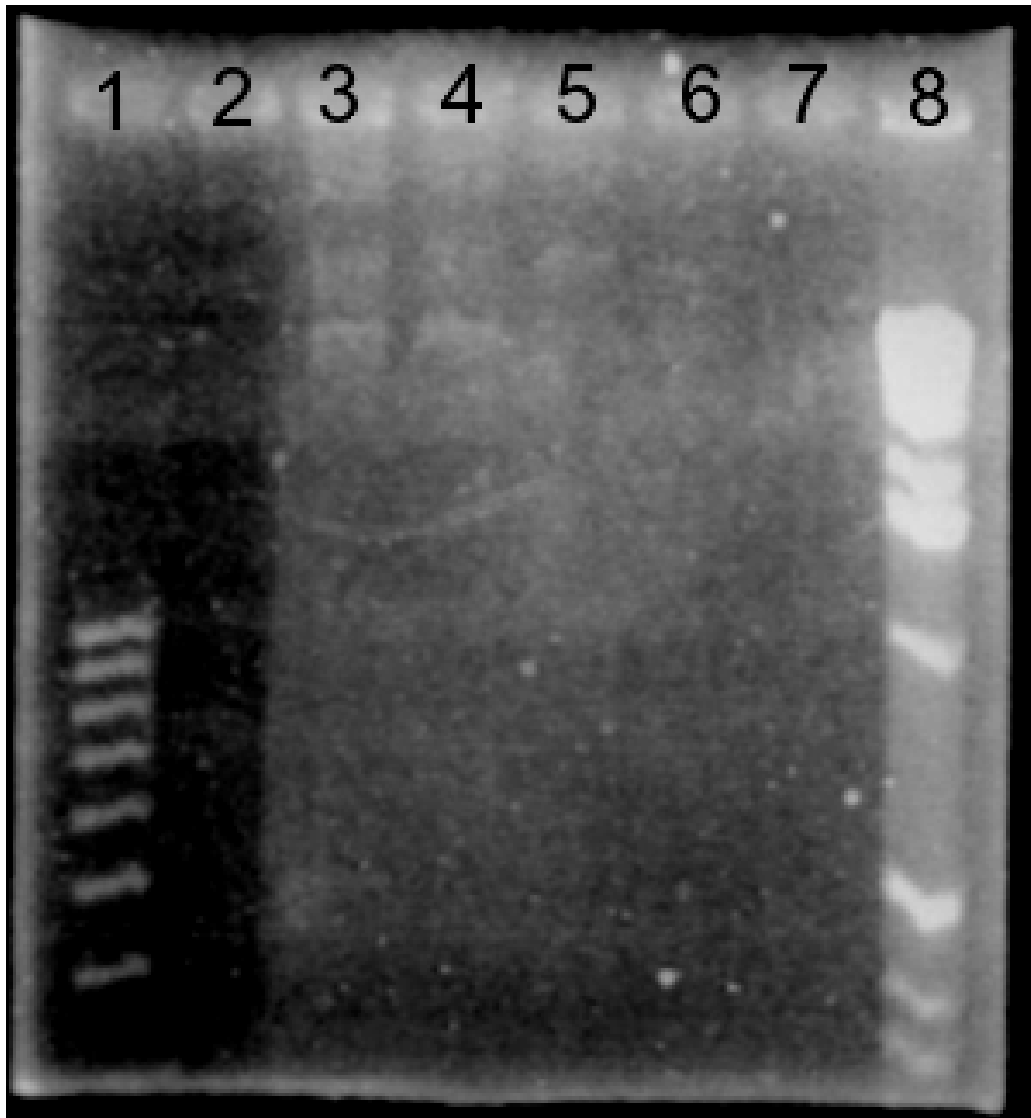
Aus dem Gel wurden die beiden unterschiedlich verdauten Vektoren extrahiert, ebenso wie die entsprechenden ca. 500 BP langen Stücke von p33ING-4 und p33ING-6 und IL-6-4 und IL-6-6.

Ergebnisse

1.8. Ergebnis der Ligation

Die ausgewählten extrahierten Vektoren wurden gemäß Methoden 2.2.14. mit den passend verdauten und extrahierten Plasmiden ligiert. Auf folgendem Agarosegel wurde die Ligation aufgetrennt (Abbildung 28).

Abbildung 28: Ergebnis der Ligation



Bildindex:

Geltasche 1: 1 Kilobasenpaarmarker in 100 bp-Schritten

Geltasche 3: Ligation Verdau von p33ING-4 mit pcDNA 3.1+

Geltasche 4: Ligation Verdau von p33ING-6 mit pcDNA 3.1+

Geltasche 5: Ligation Verdau von IL-6-4 mit pcDNA 3.1+

Geltasche 6: Ligation Verdau von IL-6-6 mit pcDNA 3.1+

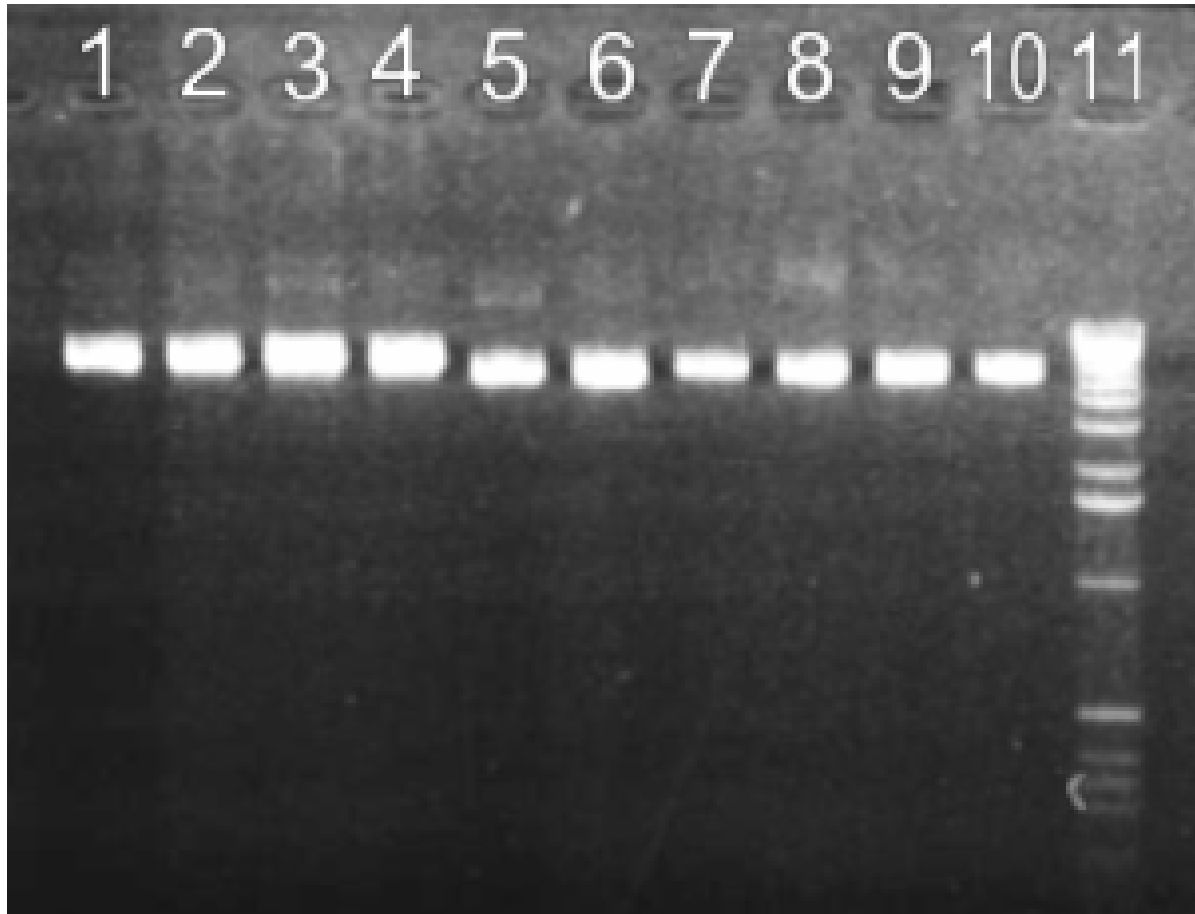
Geltasche 8: 10 Kilobasenpaarmarker in 1000 bp-Schritten

Ergebnisse

1.9. Ergebnis der Plasmidisolierung

Trotz des nicht eindeutig beurteilbaren Ergebnisses der Ligation (siehe Abbildung 28) enthielten alle angesetzten Flüssigkulturen entsprechend der unten zu sehenden elektrophoretischen Auftrennung der Plasmidisolierung gemäß Methoden 2.2.16 den pcDNA-Vektor (Abbildung 29).

Abbildung 29: Ergebnis der Plasmidisolierung



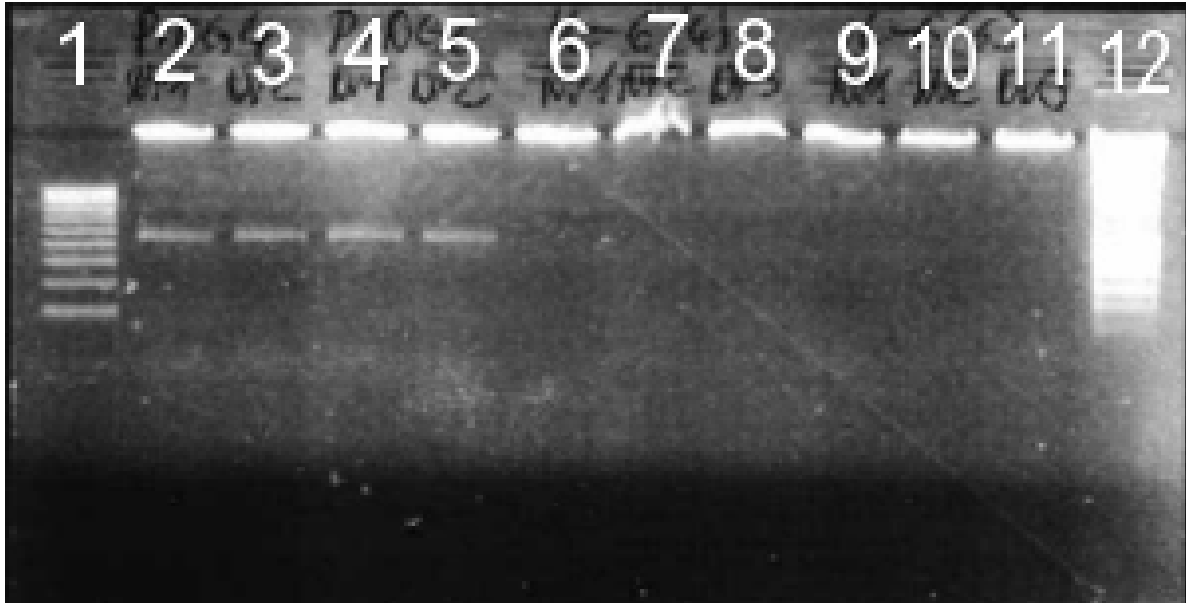
Bildindex:

- Geltasche 1: Plasmid pcDNA-p33ING-4 der Flüssigkultur Nr.1 (kurz pcDNA-p33ING-4-1)
- Geltasche 2: Plasmid pcDNA-p33ING-4 der Flüssigkultur Nr.2 (kurz pcDNA-p33ING-4-2)
- Geltasche 3: Plasmid pcDNA-p33ING-6 der Flüssigkultur Nr.1 (kurz pcDNA-p33ING-6-1)
- Geltasche 4: Plasmid pcDNA-p33ING-6 der Flüssigkultur Nr.2 (kurz pcDNA-p33ING-6-2)
- Geltasche 5: Plasmid pcDNA-IL-6-4 der Flüssigkultur Nr.1 (kurz pcDNA-IL-6-4-1)
- Geltasche 6: Plasmid pcDNA-IL-6-4 der Flüssigkultur Nr.2 (kurz pcDNA-IL-6-4-2)
- Geltasche 7: Plasmid pcDNA-IL-6-4 der Flüssigkultur Nr.3 (kurz pcDNA-IL-6-4-3)
- Geltasche 8: Plasmid pcDNA-IL-6-6 der Flüssigkultur Nr.1 (kurz pcDNA-IL-6-6-1)
- Geltasche 9: Plasmid pcDNA-IL-6-6 der Flüssigkultur Nr.2 (kurz pcDNA-IL-6-6-2)
- Geltasche 10: Plasmid pcDNA-IL-6-6 der Flüssigkultur Nr.3 (kurz pcDNA-IL-6-6-3)
- Geltasche 11: 10 Kilobasenpaarmarker in 1000 bp-Schritten

Ergebnisse

Im durchgeführten Plasmidverdau zeigte sich, daß nur die p33ING Inserts in den pcDNA3.1. Vektor aufgenommen wurden. Die IL-6 Inserts wurden nicht in den pcDNA3.1. Vektor eingebaut (Abbildung 30).

Abbildung 30: Ergebnis des Plasmidverdaus



Bildindex:

Geltasche 1: 1 Kilobasenpaarmarker in 100 bp-Schritten

Geltasche 2: Verdau mit BamH1 und EcoR5 von pcDNA-p33ING-4-1

Geltasche 3: Verdau mit BamH1 und EcoR5 von pcDNA-p33ING-4-2

Geltasche 4: Verdau mit BamH1 und EcoR5 von pcDNA-p33ING-6-1

Geltasche 5: Verdau mit BamH1 und EcoR5 von pcDNA-p33ING-6-2

Geltasche 6: Verdau mit BamH1 und EcoR5 von pcDNA-IL-6-4-1

Geltasche 7: Verdau mit BamH1 und EcoR5 von pcDNA-IL-6-4-2

Geltasche 8: Verdau mit BamH1 und EcoR5 von pcDNA-IL-6-4-3

Geltasche 9: Verdau mit BamH1 und EcoR5 von pcDNA-IL-6-6-1

Geltasche 10: Verdau mit BamH1 und EcoR5 von pcDNA-IL-6-6-2

Geltasche 11: Verdau mit BamH1 und EcoR5 von pcDNA-IL-6-6-3

Geltasche 12: 10 Kilobasenpaarmarker in 1000 bp-Schritten

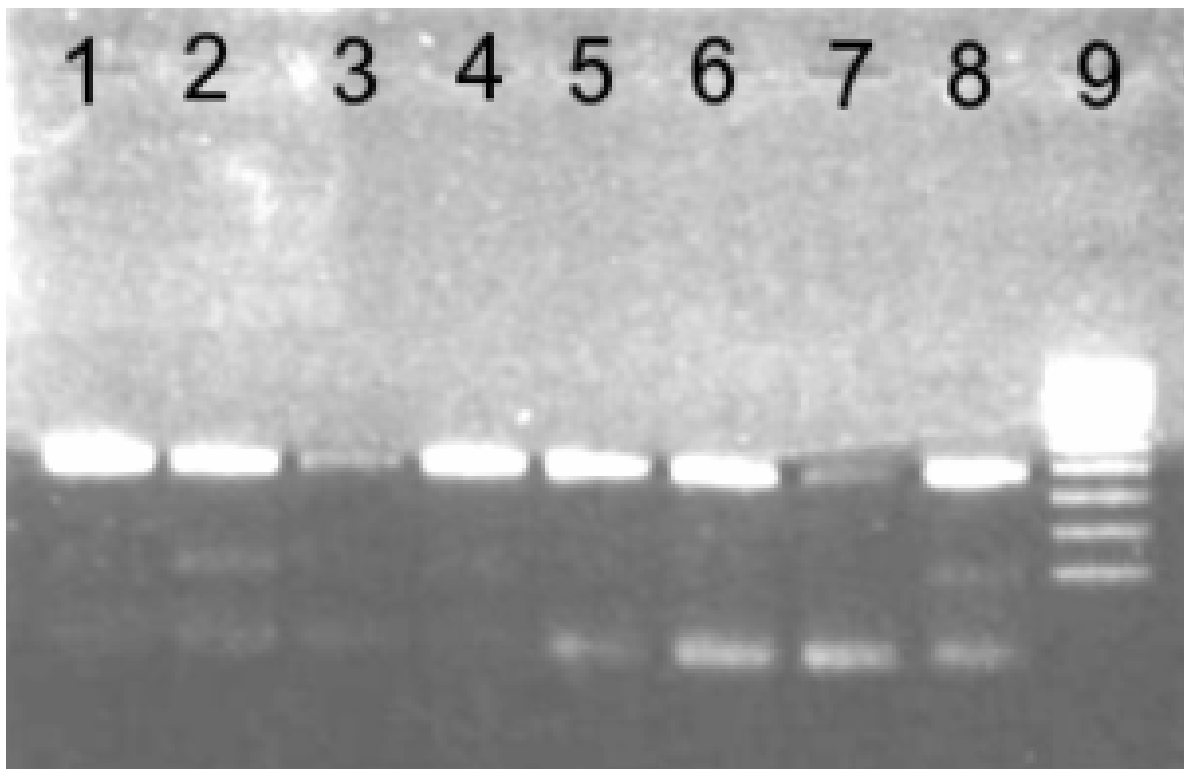
Ergebnisse

1.10. Ergebnis der alternativen Strategie für den Einbau des IL-6-Verdaus in den pcDNA3.1. Vektor

1.10.1. Ergebnis der PCR mit neu konstruierten Primern

Aufgrund des fehlenden Einbaus des IL-6-Verdaus wurden entsprechend Methoden 2.2.17 Primer (IL-6 Bam /IL-6 Eco /IL-6 Bam R /IL-6 Eco R) entworfen. Folgende Abbildung zeigt das Ergebnis der PCR mit diesen Primern (Abbildung 31).

Abbildung 31: Ergebnis der PCR mit IL-6 Bam/Eco-Primern



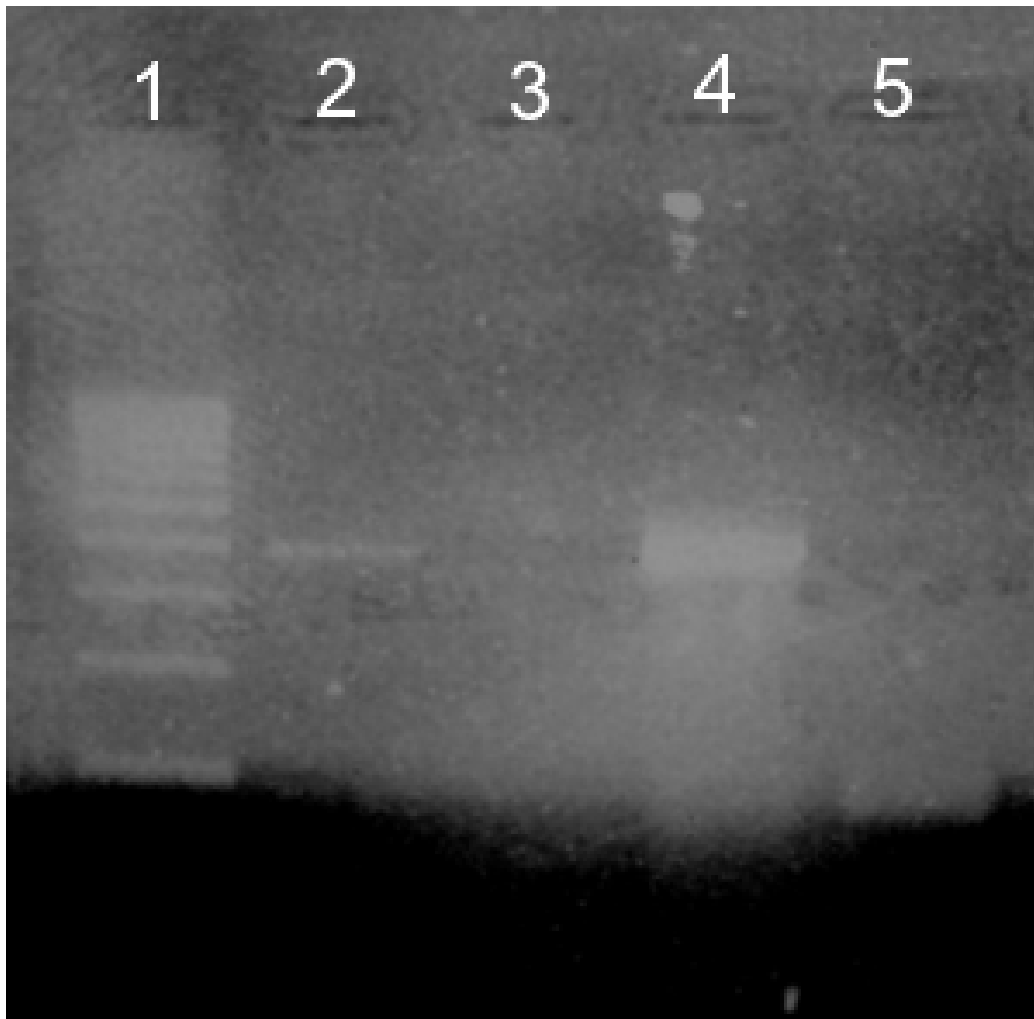
Bildindex:

- Geltasche 1: PCR mit Primern IL-6 Bam und IL-6 Eco mit cDNA RA-Pat. Nr.1
- Geltasche 2: PCR mit Primern IL-6 Bam und IL-6 Eco mit cDNA RA-Pat. Nr.2
- Geltasche 3: PCR mit Primern IL-6 Bam und IL-6 Eco mit cDNA OA-Pat.
- Geltasche 4: PCR mit Primern IL-6 Bam und IL-6 Eco mit cDNA NHDF
- Geltasche 5: PCR mit Primern IL-6 Bam R und IL-6 Eco R mit cDNA RA-Pat. Nr.1
- Geltasche 6: PCR mit Primern IL-6 Bam R und IL-6 Eco R mit cDNA RA-Pat. Nr.2
- Geltasche 7: PCR mit Primern IL-6 Bam R und IL-6 Eco R mit cDNA OA-Pat.
- Geltasche 8: PCR mit Primern IL-6 Bam R und IL-6 Eco R mit cDNA NHDF
- Geltasche 9: 1 Kilobasenpaarmarker in 100 bp-Schritten

Ergebnisse

Wiederholungs PCR mit den vielversprechendsten cDNAs (Abbildung32).

Abbildung 32: Ergebnis der zweiten PCR mit IL-6 Bam/Eco-Primern



Bildindex:

Geltasche 1: 1 Kilobasenpaarmarker in 100 bp-Schritten

Geltasche 2: PCR mit Primern IL-6 Bam und IL-6 Eco mit cDNA RA-Pat. Nr.1

Geltasche 3: PCR mit Primern IL-6 Bam und IL-6 Eco mit cDNA RA-Pat. Nr.2

Geltasche 4: PCR mit Primern IL-6 Bam R und IL-6 Eco R mit cDNA RA-Pat. Nr.1

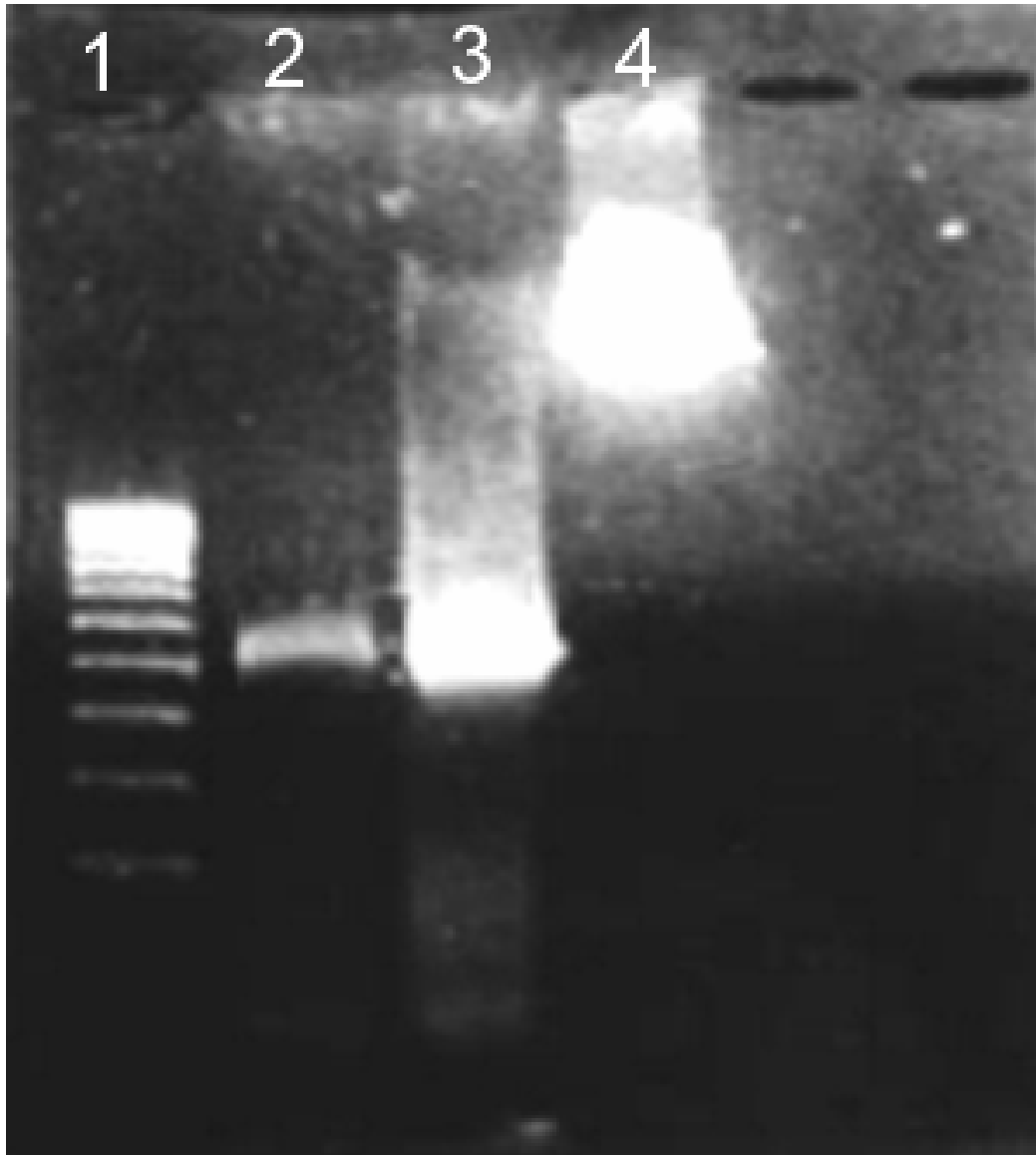
Geltasche 5: PCR mit Primern IL-6 Bam R und IL-6 Eco R mit cDNA RA-Pat. Nr.2

Ergebnisse

1.10.2. Ergebnis des enzymatischen Verdaus der PCR-Produkte und des pcDNA-Vektors

Die PCR-Produkte der Wiederholungs-PCR von cDNA des RA-Pat. Nr.1 wurden geextrahiert und dann mit den Enzymen Bam H1 und Eco R5 verdaut, ebenso wurde mit dem Vektor pcDNA3.1. verfahren (Abbildung 33).

Abbildung 33: Ergebnis des Verdaus



Bildindex:

Geltasche 1: 1 Kilobasenpaarmarker in 100 bp-Schritten

Geltasche 2: Verdau der PCR mit Primern IL-6 Bam und IL-6 Eco mit Bam H1 und Eco R5

Geltasche 3: Verdau der PCR mit Primern IL-6 Bam R und IL-6 Eco R mit Bam H1 und Eco R5

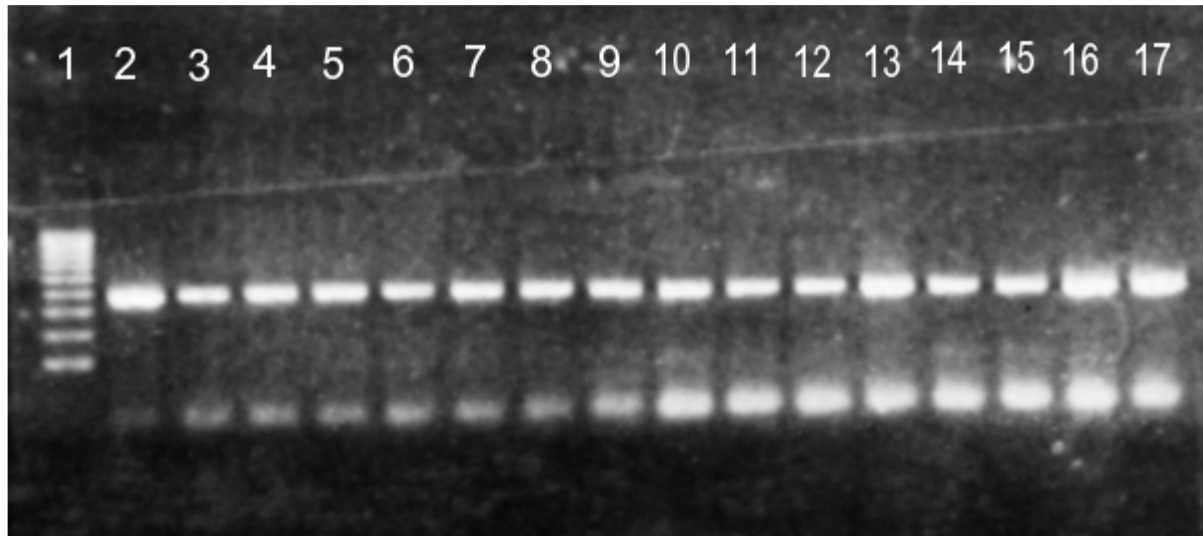
Geltasche 4: Verdau des pcDNA3.1-Vektors mit Bam H1 und Eco R5

Ergebnisse

1.10.3. Ergebnis der Transformation und Klonierung der Bakterien mit dem pcDNA3.1.Vektor

Die extrahierten Produkte wurden ligiert und Bakterien mit dem Plasmid transformiert. Die Abbildung 34 zeigt die PCR mit den transformierten Bakterien.

Abbildung 34: Ergebnis der PCR mit den transformierten Bakterien



Bildindex:

Geltasche 1: 1 Kilobasenpaarmarker in 100 bp-Schritten

Geltasche 2: PCR mit Primern IL-6 Bam und IL-6 Eco und Bakterienkolonie Nr.1 mit integriertem pcDNA-Vektor mit IL-6 Bam/Eco Verdau

Geltasche 3: : PCR mit Primern IL-6 Bam und IL-6 Eco und Bakterienkolonie Nr.2 mit integriertem pcDNA-Vektor mit IL-6 Bam/Eco Verdau

Geltasche 4: : PCR mit Primern IL-6 Bam und IL-6 Eco und Bakterienkolonie Nr.3 mit integriertem pcDNA-Vektor mit IL-6 Bam/Eco Verdau

Geltasche 5: : PCR mit Primern IL-6 Bam und IL-6 Eco und Bakterienkolonie Nr.4 mit integriertem pcDNA-Vektor mit IL-6 Bam/Eco Verdau

Geltasche 6: : PCR mit Primern IL-6 Bam und IL-6 Eco und Bakterienkolonie Nr.5 mit integriertem pcDNA-Vektor mit IL-6 Bam/Eco Verdau

Geltasche 7: : PCR mit Primern IL-6 Bam und IL-6 Eco und Bakterienkolonie Nr.6 mit integriertem pcDNA-Vektor mit IL-6 Bam/Eco Verdau

Geltasche 8: PCR mit Primern IL-6 Bam und IL-6 Eco und Bakterienkolonie Nr.7 mit integriertem pcDNA-Vektor mit IL-6 Bam/Eco Verdau

Geltasche 9: PCR mit Primern IL-6 Bam und IL-6 Eco und Bakterienkolonie Nr.8 mit integriertem pcDNA-Vektor mit IL-6 Bam/Eco Verdau

Geltasche 10: PCR mit Primern IL-6 Bam R und IL-6 Eco R und Bakterienkolonie Nr.1 mit integriertem pcDNA-Vektor mit IL-6 BamR/EcoR Verdau

Geltasche 11: PCR mit Primern IL-6 Bam R und IL-6 Eco R und Bakterienkolonie Nr.2 mit integriertem pcDNA-Vektor mit IL-6 BamR/EcoR Verdau

Geltasche 12: PCR mit Primern IL-6 Bam R und IL-6 Eco R und Bakterienkolonie Nr.3 mit integriertem pcDNA-Vektor mit IL-6 BamR/EcoR Verdau

Geltasche 13: PCR mit Primern IL-6 Bam R und IL-6 Eco R und Bakterienkolonie Nr.4 mit integriertem pcDNA-Vektor mit IL-6 BamR/EcoR Verdau

Geltasche 14: PCR mit Primern IL-6 Bam R und IL-6 Eco R und Bakterienkolonie Nr.5 mit integriertem pcDNA-Vektor mit IL-6 BamR/EcoR Verdau

Geltasche 15: PCR mit Primern IL-6 Bam R und IL-6 Eco R und Bakterienkolonie Nr.6 mit integriertem pcDNA-Vektor mit IL-6 BamR/EcoR Verdau

Geltasche 16: PCR mit Primern IL-6 Bam R und IL-6 Eco R und Bakterienkolonie Nr.7 mit integriertem pcDNA-Vektor mit IL-6 BamR/EcoR Verdau

Geltasche 17: PCR mit Primern IL-6 Bam R und IL-6 Eco R und Bakterienkolonie Nr.8 mit integriertem pcDNA-Vektor mit IL-6 BamR/EcoR Verdau

Ergebnisse

2. Ergebnis der RNA-Sonden Herstellung

Nach Herstellung der RNA-Sonden wie in Methoden 2.3. beschrieben, wurden diese auf 1%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Abbildung 35).

Abbildung 35: Ergebnis der RNA-Sondenherstellung



Bildindex:

Geltasche 1: 1 Kilobasenpaarmarker in 100 bp-Schritten

Geltasche 2: RNA-Sonde des mit BamH1 linearisierten Vektors mit integriertem IL-6, der mit T7 RNA Polymerase transkribiert wurde

Geltasche 3: RNA-Sonde des mit EcoR5 linearisierten Vektors mit integriertem IL-6, der mit SP6 RNA Polymerase transkribiert wurde

Geltasche 4: RNA-Sonde des mit BamH1 linearisierten Vektors mit integriertem p33ING, der mit T7 RNA Polymerase transkribiert wurde

Geltasche 5: RNA-Sonde des mit EcoR5 linearisierten Vektors mit integriertem p33ING, der mit SP6 RNA Polymerase transkribiert wurde

Die Konzentrationsbestimmung mittels Ethidiumbromidplatte und RNA-Standards der Konzentrationen 12,5/25/50/100/200 ng/dl ergab für alle RNA-Sonden eine Konzentration von ca. 50 ng/dl.

Ergebnisse

3. Ergebnisse der Transfektion

3.1. Ergebnis der Transfektion mit RNA und Effectene

Die, nach der Transfektion der Fibroblasten (Methode 2.4.2.), durchgeführte mikroskopische Kontrolle der Zellen erbrachte folgendes Ergebnis:

Tabelle 41:

	vor Transfektion	Nach 24 h	Nach 48 h	Nach 72 h
Well 1: Transfektion mit 5 µl sense- RNA	Konfluent ca. 60% Vakuolen +/-	Konfluent ca. 30% Apoptotische Zellen ++ Granulierte Zellen ++	Konfluent ca. 60% Apoptotische Zellen + Granulierte Zellen ++ Vitale Zellen: Rand - - ; Mitte +	Konfluent ca. 70% Apoptotische Zellen + Granulierte Zellen + Vitale Zellen: Rand - - ; Mitte +
Well 2: Transfektion mit 5 µl antisense-RNA	Konfluent ca. 60% Vakuolen +/-	Konfluent ca. 40% Apoptotische Zellen + Granulierte Zellen ++	Konfluent ca. 60% Apoptotische Zellen + Granulierte Zellen ++ Vitale Zellen: Rand - - ; Mitte +	Konfluent ca. 70% Apoptotische Zellen + Granulierte Zellen + Vitale Zellen: Rand - - ; Mitte +/-
Well 3: Transfektion mit 1,25 µl doppelstrang- RNA	Konfluent ca. 60% Vakuolen +/-	Konfluent ca. 40% Apoptotische Zellen + Granulierte Zellen ++	Konfluent ca. 50% Apoptotische Zellen + Granulierte Zellen ++ Vitale Zellen: Rand - - ; Mitte +	Konfluent ca. 70% Apoptotische Zellen + Granulierte Zellen + Vitale Zellen: Rand - - ; Mitte +
Well 4: Transfektion mit 2,5 µl doppelstrang- RNA	Konfluent ca. 60% Vakuolen +/-	Konfluent ca. 40% Apoptotische Zellen + Granulierte Zellen ++	Konfluent ca. 50% Apoptotische Zellen + Granulierte Zellen ++ Vitale Zellen: Rand - - ; Mitte +	Konfluent ca. 60% Apoptotische Zellen ++ Granulierte Zellen + Vitale Zellen: Rand - - ; Mitte +
Well 5: Transfektion mit 3,75 µl doppelstrang- RNA	Konfluent ca. 60% Vakuolen +/-	Konfluent ca. 35% Apoptotische Zellen + Granulierte Zellen ++	Konfluent ca. 50% Apoptotische Zellen + Granulierte Zellen ++ Vitale Zellen: Rand - - ; Mitte +	Konfluent ca. 50% Apoptotische Zellen ++ Granulierte Zellen + Vitale Zellen: Rand - - ; Mitte +/-
Well 6: Untransfizierte Zellen nur mit EC-Buffer	Konfluent ca. 60% Vakuolen +/-	Konfluent ca. 35% Apoptotische Zellen + Granulierte Zellen ++	Konfluent ca. 60% Apoptotische Zellen - Granulierte Zellen ++ Vitale Zellen: Rand +/- ; Mitte ++	Konfluent ca. 90% Apoptotische Zellen - Granulierte Zellen +/- Vitale Zellen: Rand + ; Mitte +++

Ergebnisse

Bei einer erneuten Transfektion mit markierten RNA-Sonden wie in Methoden 2.5.6 beschrieben, wurden zwei 6-Well-Platten mit derselben Zellreihe hergestellt. Eine 6-Well-Platte wurde 24 h inkubiert, dann mikroskopisch kontrolliert und anschließend eine Digoxigenin-AP-Ak-Färbung durchgeführt. Die zweite Platte wurde 48 h inkubiert, dann wurde wie mit der ersten Platte verfahren.

Das Ergebnis der mikroskopischen Kontrolle der ersten 6-Well-Platte:

Tabelle 42:

	Vor Transfektion	Nach 24 h
Well 1: Transfektion mit 5 µl sense-RNA	Konfluent ca. 60 % Well nur in einer Hälfte mit Zellen bewachsen	Konfluent ca. 40% Apoptotische Zellen ++ Vitale Zellen (+)
Well 2: Transfektion mit 5 µl antisense-RNA	Konfluent ca. 60 % Well nur in einer Hälfte mit Zellen bewachsen	Konfluent ca. 40% Apoptotische Zellen ++ Vitale Zellen (+)
Well 3: Transfektion mit 2,5 µl doppelstrang-RNA	Konfluent ca. 60 % Well nur in einer Hälfte mit Zellen bewachsen	Konfluent ca. 30% Apoptotische Zellen +++ Vitale Zellen - -
Well 4: Transfektion mit 5 µl doppelstrang-RNA	Konfluent ca. 60 % Well nur in einer Hälfte mit Zellen bewachsen	Konfluent ca. 40% Apoptotische Zellen ++ Vitale Zellen (+)
Well 5: Untransfizierte Zellen nur mit Effectene	Konfluent ca. 60 % Well nur in einer Hälfte mit Zellen bewachsen	Konfluent ca. 60 % Well nur in einer Hälfte mit Zellen bewachsen
Well 6: Untransfizierte Zellen ohne Zugabe von Effectene	Konfluent ca. 60 % Well nur in einer Hälfte mit Zellen bewachsen	Konfluent ca. 60 % Well nur in einer Hälfte mit Zellen bewachsen

Ergebnisse

Ergebnis der mikroskopischen Kontrolle der zweiten 6-Well-Platte:

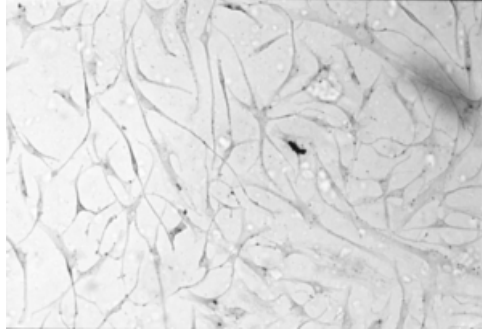
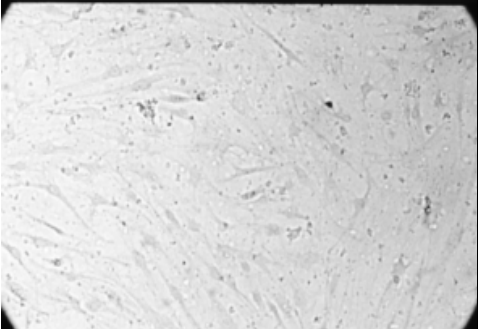
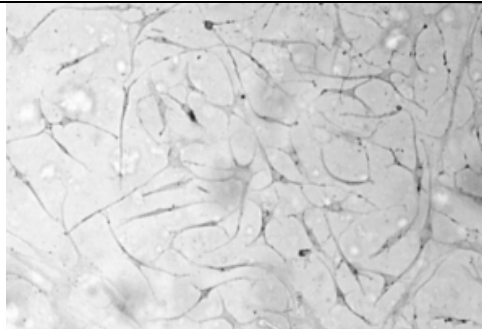
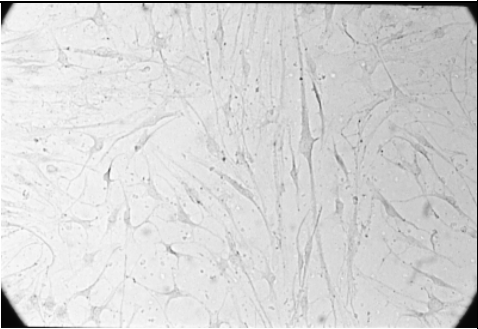
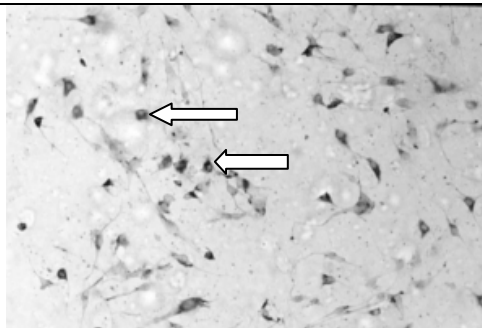
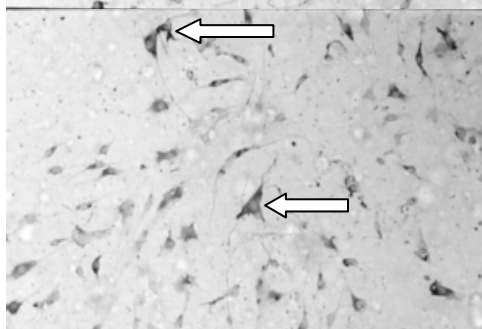
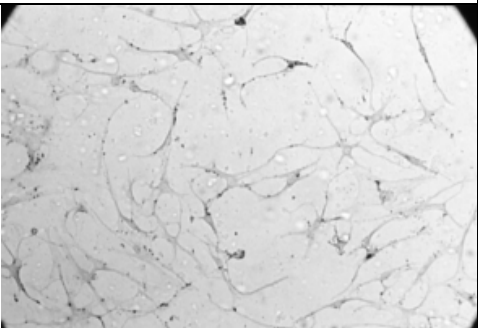
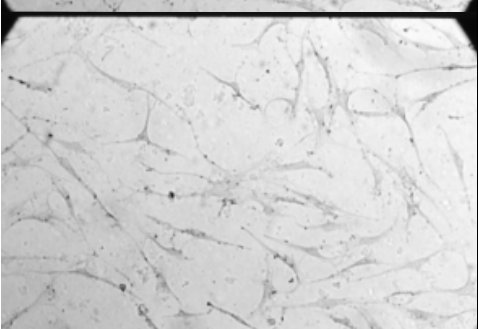
Tabelle 43:

	Vor Transfektion	Nach 24 h	Nach 48 h
Well 1: Transfektion mit 5 µl sense-RNA	Konfluent ca. 70 %	Konfluent ca. 70 % Apoptotische Zellen + Vitale Zellen:+ Vakuolen + +	Konfluent ca. 70 % Apoptotische Zellen + Vitale Zellen:+ Vakuolen + +
Well 2: Transfektion mit 5 µl antisense-RNA	Konfluent ca. 70 %	Konfluent ca. 70 % Apoptotische Zellen + Vitale Zellen:+ Vakuolen + +	Konfluent ca. 70 % Apoptotische Zellen + Vitale Zellen:+ Vakuolen + +
Well 3: Transfektion mit 2,5µl doppelstrang-RNA	Konfluent ca. 70 %	Konfluent ca. 70 % Apoptotische Zellen + Vitale Zellen:+ Vakuolen + +	Konfluent ca. 70 % Apoptotische Zellen + Vitale Zellen:+ Vakuolen + +
Well 4: Transfektion mit 5 µl doppelstrang-RNA	Konfluent ca. 70 %	Konfluent ca. 60 % Apoptotische Zellen ++ Vitale Zellen:+ Vakuolen + + +	Konfluent ca. 60 % Apoptotische Zellen ++ Vitale Zellen:+ Vakuolen + + +
Well 5: Untransfizierte Zellen nur mit Effectene	Konfluent ca. 70 %	Konfluent ca. 70 % Unverändert	Konfluent ca. 70 % Unverändert
Well 6: Untransfizierte Zellen ohne Zugabe von Effectene	Konfluent ca. 70 % Well nur in einer Hälfte mit Zellen bewachsen	Konfluent ca. 70 % Well nur in einer Hälfte mit Zellen bewachsen Unverändert	Konfluent ca. 70 % Well nur in einer Hälfte mit Zellen bewachsen Unverändert

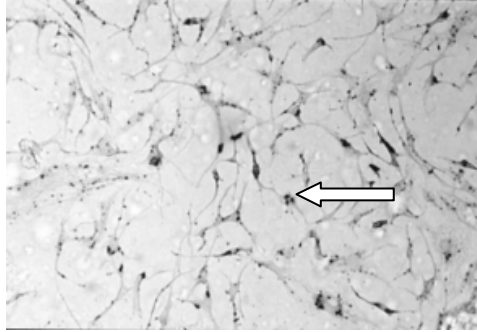
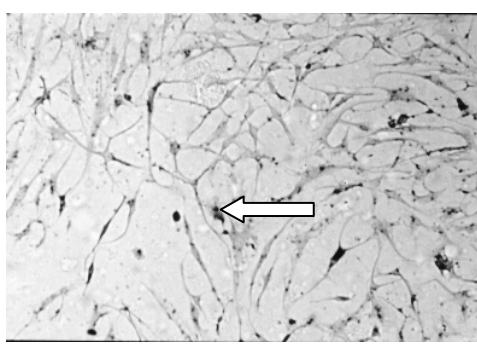
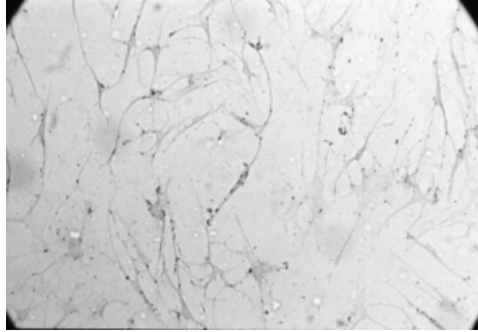
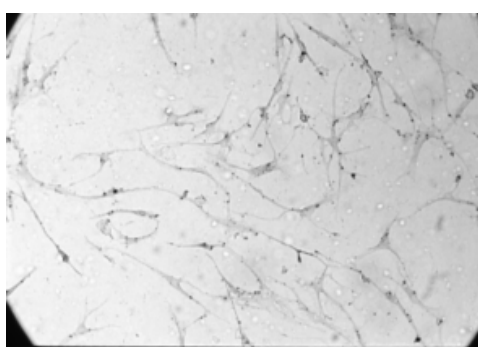
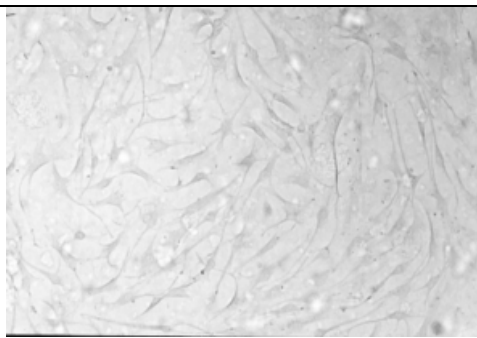
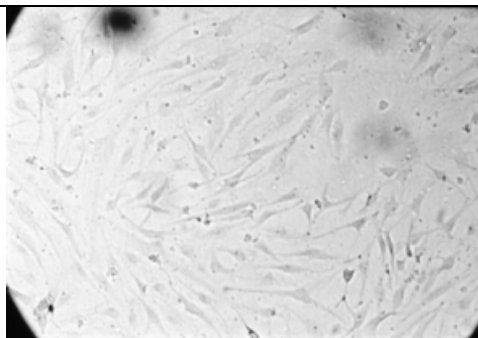
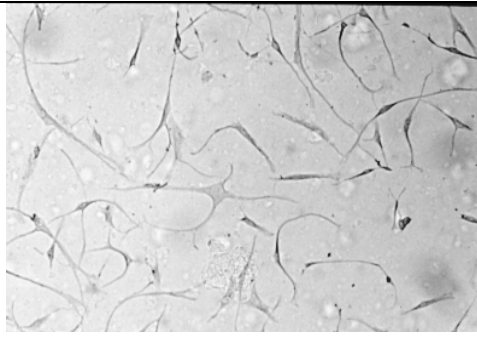
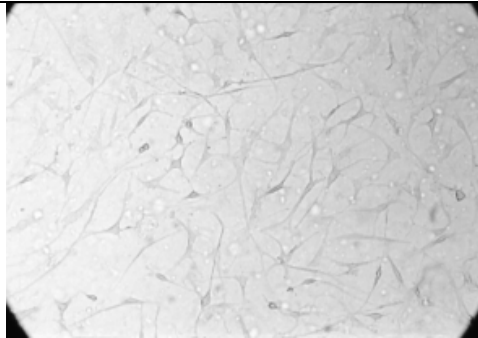
Ergebnisse

In der Digoxigenin-AP-Ak-Färbung, wie in Methoden 2.5.6. beschrieben, zeigte sich folgendes Ergebnis:

Tabelle 44: Ergebnis der Digoxigenin-AP-Ak-Färbung

	Nach 24 h	Nach 48 h
Well 1: Transfektion mit 5 µl sense-RNA		
Well 2: Transfektion mit 5 µl antisense-RNA		
Well 3: Transfektion mit 2,5 µl doppel- strang-RNA	 	 

Ergebnisse

Well 4: Transfektion mit 5 µl doppel- strang-RNA	 	 
Well 5: Untransfizierte Zellen nur mit Effectene		
Well 6: Untransfizierte Zellen ohne Effectene		

Bildindex:



Zellen mit schwerlöslichen, dunklen Präzipitaten der Digoxigenin-AP-Ak-Färbung,
d.h. Zellen, die erfolgreich transfiziert wurden

Die Präzipitate zeigen sich in der schwarz-weiß-Darstellung als dunklere Punkte im Zellkern, wie bei den Transfektionen mit Doppelstrang-RNA nach 24 h zu sehen ist.

Ergebnisse

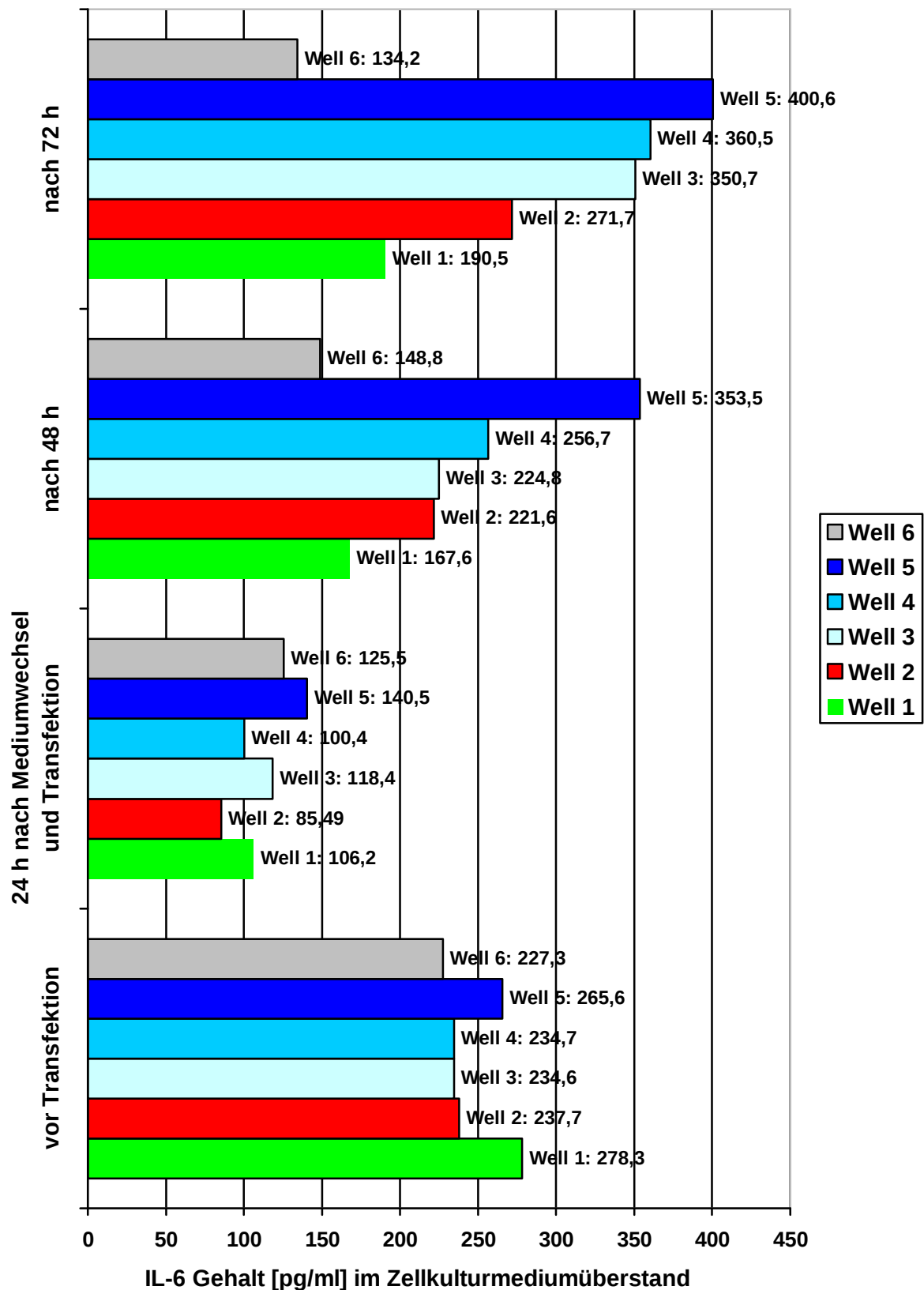
Bei allen Transfektionen mit RNA wurden Überstände der Zellkulturen zur Durchführung eines IL-6 ELISA abgenommen. Es wurde wie in Methoden 2.5.1. beschrieben verfahren. Die anschließende photometrische Messung erbrachte die in den folgenden Tabellen (45 und 46) und Grafiken (Abbildung 36 und 37) dargestellten Ergebnisse.

Tabelle 45:

ELISA 1 Nachweis des IL-6 Gehaltes im Überstand	Werte in den Zellkultur-medium- überständen vor Transfektion	Werte in den Zellkultur- medium- überständen nach 24 h	Werte in den Zellkultur- medium- überständen nach 48 h	Werte in den Zellkultur- medium- überständen nach 72h
Well 1 (grün): Transfektion mit 5 µl (ca. 250 ng) sense-RNA	278,3 pg/ml	106,2 pg/ml	167,6 pg/ml	190,5 pg/ml
Well 2 (rot): Transfektion mit 5 µl (ca. 250 ng) antisense-RNA	237,7 pg/ml	85,49 pg/ml	221,6 pg/ml	271,7 pg/ml
Well 3 (helltürkis): Transfektion mit 1,25 µl (ca. 62,5 ng) doppelstrang- RNA	234,6 pg/ml	118,4 pg/ml	224,8 pg/ml	350,7 pg/ml
Well 4 (hellblau): Transfektion mit 2,5 µl (ca. 125 ng) doppelstrang-RNA	234,7 pg/ml	100,4 pg/ml	256,7 pg/ml	360,5 pg/ml
Well 5 (blau): Transfektion mit 3,75 µl (ca. 190ng) doppelstrang-RNA	265,6 pg/ml	140,5 pg/ml	353,5 pg/ml	400,6 pg/ml
Well 6 (grau): Untransfizierte Zellen nur mit EC- Buffer	227,3 pg/ml	125,5 pg/ml	148,8 pg/ml	134,2 pg/ml

Ergebnisse

Abbildung 36: Ergebnisse des ersten IL-6 ELISA



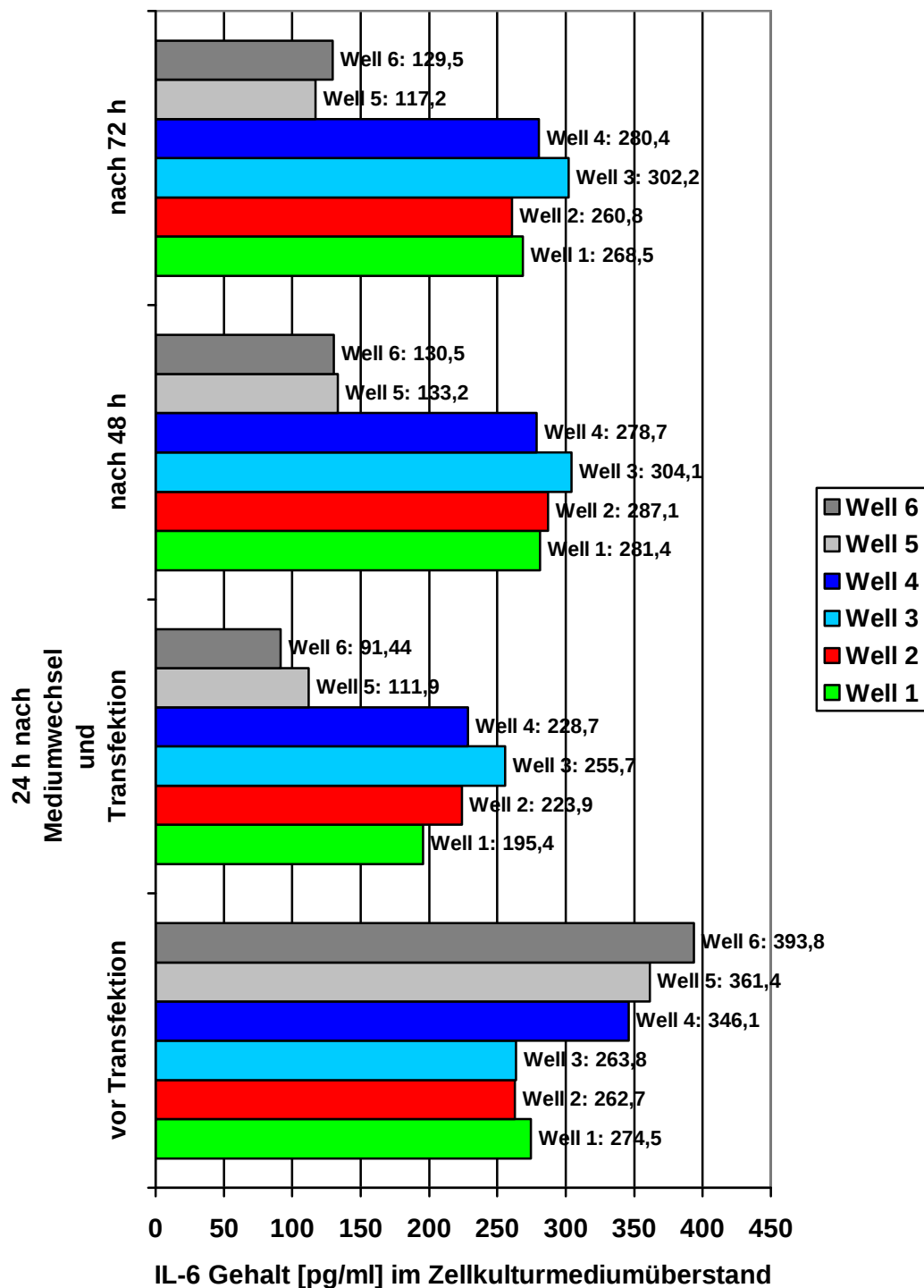
Ergebnisse

Tabelle 46:

ELISA 2 Nachweis des IL-6 Gehaltes im Überstand	Werte in den Zellkultur-medium- überständen vor Transfektion	Werte in den Zellkultur-medium- überständen nach 24 h	Werte in den Zellkultur-medium- überständen nach 48 h	Werte in den Zellkultur-medium- überständen nach 72h
Well 1 (grün): Transfektion mit 2 µl (ca. 100 ng) sense-RNA	274,5 pg/ml	195,4 pg/ml	281,4 pg/ml	268,5 pg/ml
Well 2 (rot): Transfektion mit 2 µl (ca. 100 ng) antisense-RNA	262,7 pg/ml	223,9 pg/ml	287,1 pg/ml	260,8 pg/ml
Well 3 (hellblau): Transfektion mit 1 µl (ca. 50 ng) doppelstrang- RNA	263,8 pg/ml	255,7 pg/ml	304,1 pg/ml	302,2 pg/ml
Well 4 (blau): Transfektion mit 1,5 µl (ca. 75 ng) doppelstrang- RNA	346,1 pg/ml	228,7 pg/ml	278,7 pg/ml	280,4 pg/ml
Well 5 (hellgrau): Untransfizierte Zellen mit Effectene	361,4 pg/ml	111,9 pg/ml	133,2 pg/ml	117,2 pg/ml
Well 6 (grau): Untransfizierte Zellen ohne Effectene	393,8 pg/ml	91,44 pg/ml	130,5 pg/ml	129,5 pg/ml

Ergebnisse

Abbildung 37: Ergebnisse des zweiten IL-6 ELISA



Aus den ermittelten Werten ließ sich keine reproduzierbare Wirkung der Transfektion auf die Expression von IL-6 feststellen. Daher wurde die Transfektion von RNA zugunsten der Transfektion mit Plasmiden verlassen.

Ergebnisse

3.2. Ergebnis der Transfektion mit Plasmiden und Effectene

Die ausgewählten Zellen wurden gemäß Methoden 2.4.3.1. transfiziert.

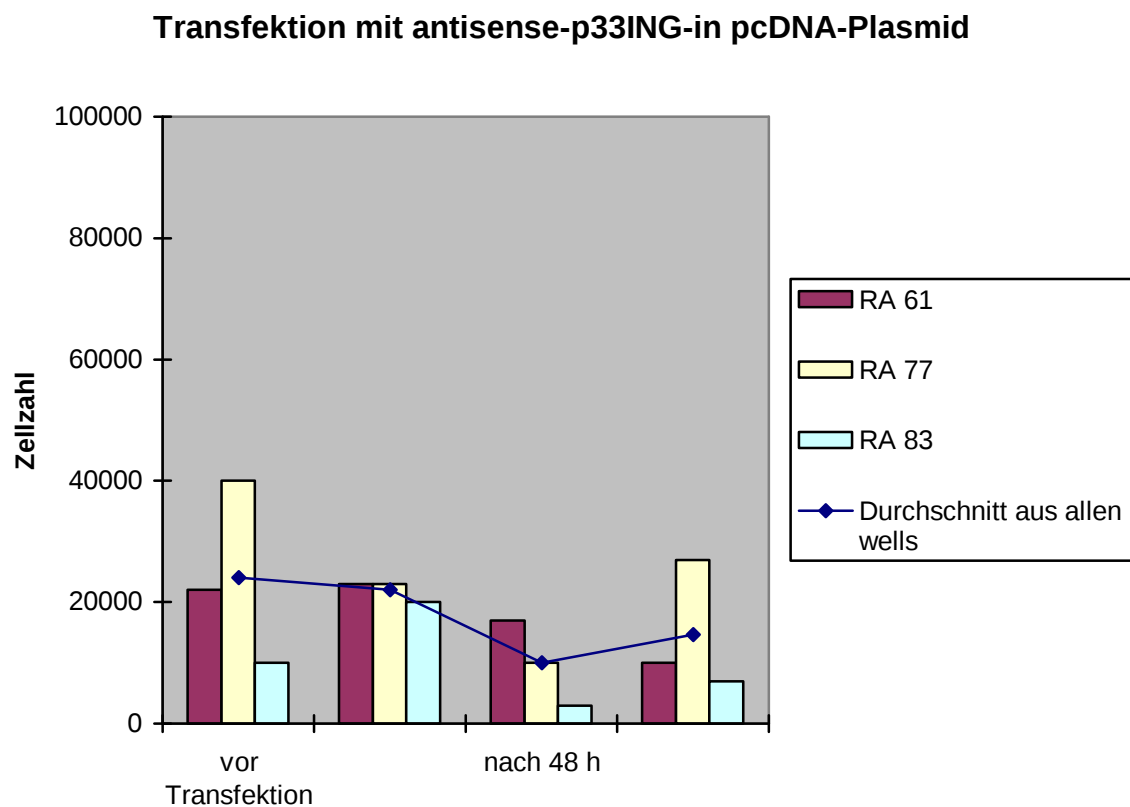
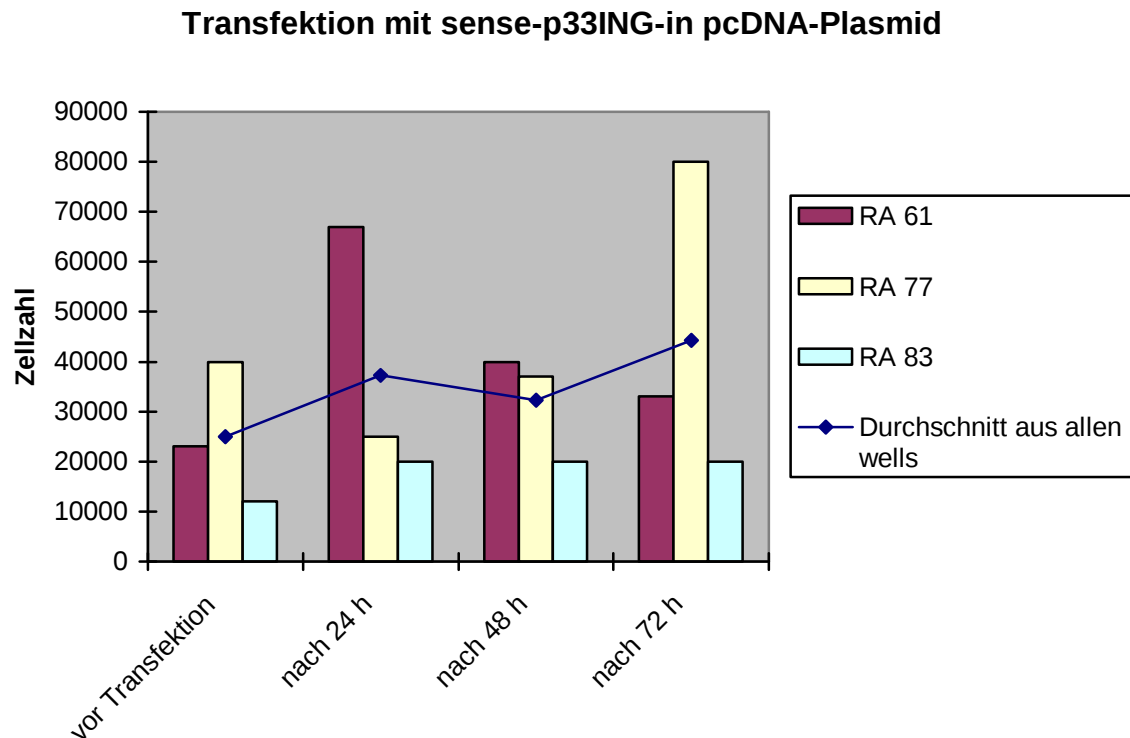
Um die Auswirkungen auf das Wachstum und Überleben der Zellen zu dokumentieren, wurde in möglichst gleichmäßig bewachsenen 6-wells durch Abtrypsinieren der Zellen eines Wells vor Transfektion, nach 24 h, 48 h und 72 h die Zellzahl bestimmt. Hierbei ergaben sich folgende Werte:

Tabelle 47:

Zellzahl nach Transfektion mit:		Vor Transfektion	Nach 24 h	Nach 48 h	Nach 72 h
0,8 µg Sense- p33ING in PcDNA- Plasmid und 10 µl Effectene	Zellreihe RA 61	23000	67000	40000	33000
	Zellreihe RA83	12000	20000	20000	20000
	Zellreihe RA 77	40000	25000	37000	80000
0,8 µg Antisense- p33ING in PcDNA- Plasmid und 10 µl Effectene	Zellreihe RA61	22000	23000	17000	10000
	Zellreihe RA 83	10000	20000	3000	7000
	Zellreihe RA 77	40000	23000	10000	27000
0,8 µg "leerem" PcDNA- Plasmid und 10 µl Effectene	Zellreihe RA 61	13000	50000	10000	17000
	Zellreihe RA83	8000	30000	7000	10000
	Zellreihe RA 77	30000	28000	40000	27000
Kontrolle ohne Transfektion	Zellreihe RA 61	12000	33000	37000	30000
	Zellreihe RA83	18000	37000	60000	60000
	Zellreihe RA 77	30000	7000	63000	57000

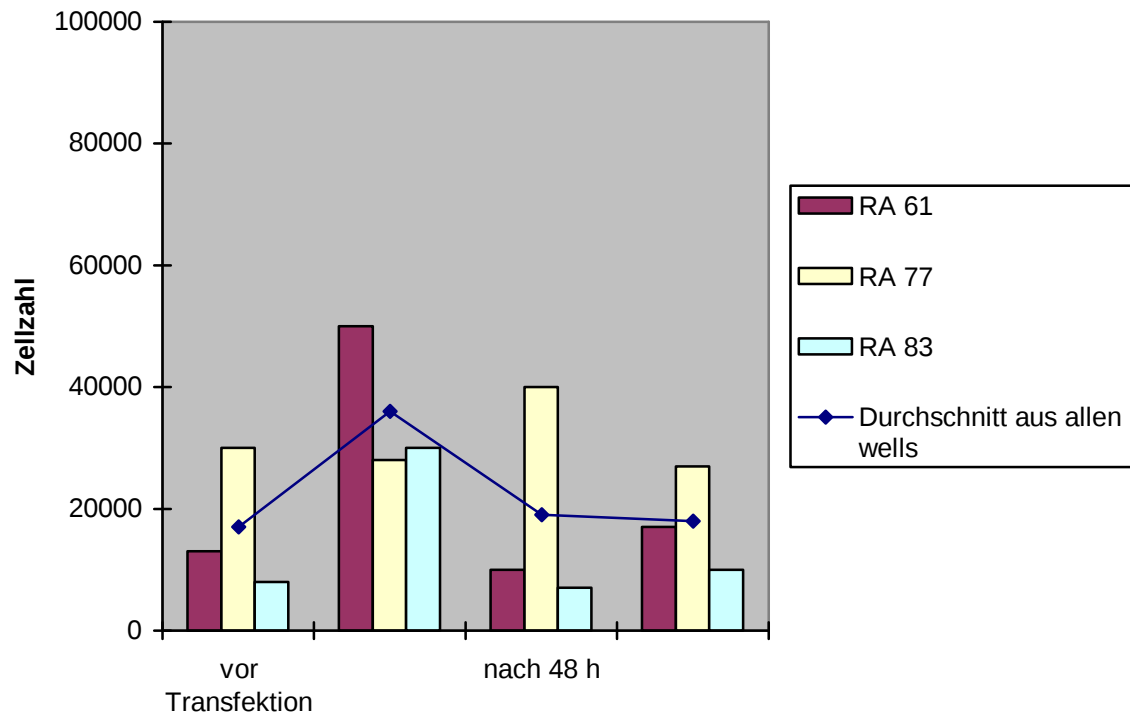
Ergebnisse

Abbildung 38: Zellzahlentwicklung nach Transfektion mit p33ING in pcDNA-Plasmid und Effectene

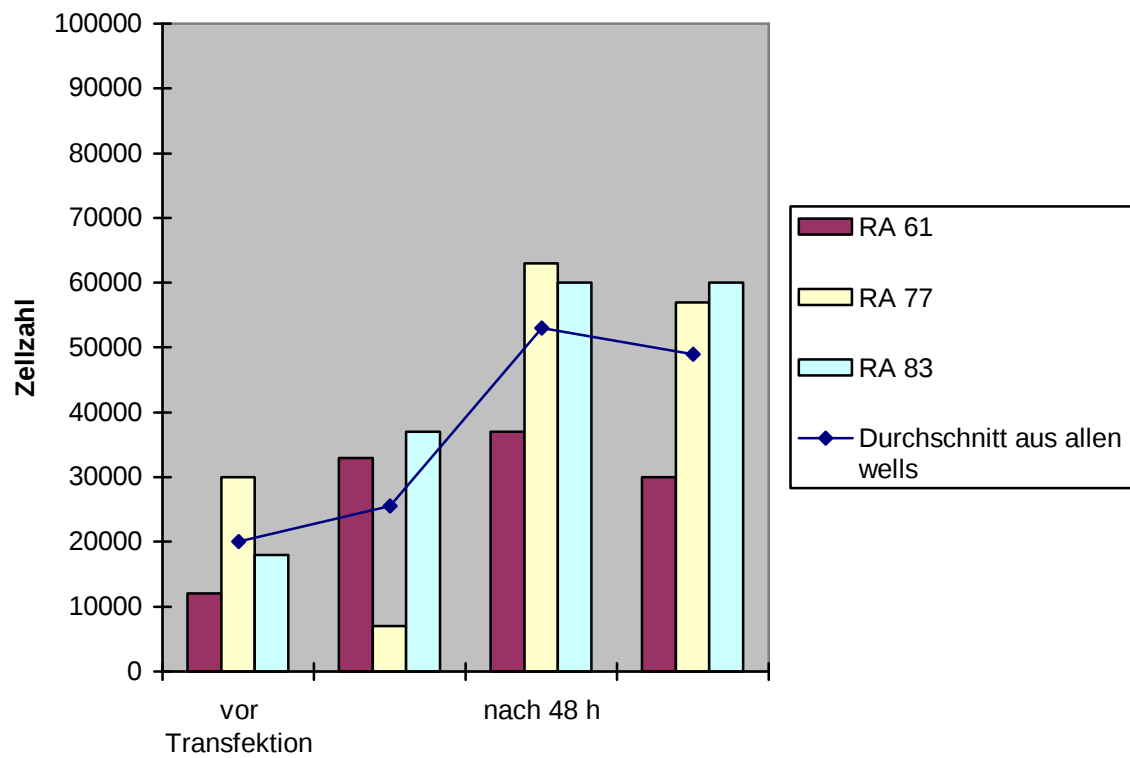


Ergebnisse

Transfektion mit "leerem" pcDNA-Plasmid



Zellen ohne Transfektion



Ergebnisse

Transfektion vom 29.04.2000 mit Effectene und GFP. Beurteilung des Zellwachstums und der Transfektionsrate mittels Fluoreszenz:

Tabelle 48:

Art der Transfektion	Vor Transfektion	Nach 24 h	Nach 48 h	Nach 72 h GFP Fluoreszenz-kontrolle
Well1: 0,2 µg GFP, 2 µl Effectene, 1,6 µl Enhancer, 98,2 µl EC- Buffer	Konfluent ca. 70% Vakuolen: - Apoptotische Zellen im Überstand: +	Konfluent ca. 70% Vakuolen: - Apoptotische Zellen im Überstand: (+)	Konfluent ca. 75% Vakuolen: - Apoptotische Zellen im Überstand: +	Fluoreszierende Zellen: (+)
Well 2: 0,2 µg GFP, 5 µl Effectene, 1,6 µl Enhancer, 98,2 µl EC- Buffer	Konfluent ca. 40% Vakuolen: - Apoptotische Zellen im Überstand: (+)	Konfluent ca. 40% Vakuolen: + Apoptotische Zellen im Überstand: (+)	Konfluent ca. 35% Vakuolen: + Apoptotische Zellen im Überstand: +	Fluoreszierende Zellen: -
Well 3: 0,2 µg GFP, 10 µl Effectene, 1,6 µl Enhancer, 98,2 µl EC- Buffer	Konfluent ca. 50% Vakuolen: - Apoptotische Zellen im Überstand: (+)	Konfluent ca. 45% Vakuolen: ++ Apoptotische Zellen im Überstand: +	Konfluent ca. 35% Vakuolen: +++ Apoptotische Zellen im Überstand: ++	Fluoreszierende Zellen: -
Well4: 0,4 µg GFP, 4 µl Effectene, 3,2 µl Enhancer, 96,4 µl EC- Buffer	Konfluent ca. 55% Vakuolen: - Apoptotische Zellen im Überstand: (+)	Konfluent ca. 55% Vakuolen: - Apoptotische Zellen im Überstand: (+)	Konfluent ca. 40% Vakuolen: - Apoptotische Zellen im Überstand: +++	Fluoreszierende Zellen: +
Well 5: 0,4 µg GFP, 10 µl Effectene, 3,2 µl Enhancer, 96,4 µl EC- Buffer	Konfluent ca. 55% Vakuolen: - Apoptotische Zellen im Überstand: (+)	Konfluent ca. 45% Vakuolen: + Apoptotische Zellen im Überstand: +	Konfluent ca. 40% Vakuolen: ++ Apoptotische Zellen im Überstand: ++	Fluoreszierende Zellen: (+)
Well 6: 0,4 µg GFP, 20 µl Effectene, 3,2 µl Enhancer, 96,4 µl EC- Buffer	Konfluent ca. 60% Vakuolen: - Apoptotische Zellen im Überstand: +	Konfluent ca. 45% Vakuolen: ++ Apoptotische Zellen im Überstand: ++	Konfluent ca. 40% Vakuolen: ++ Apoptotische Zellen im Überstand: +++	Fluoreszierende Zellen: -

Ergebnisse

Well 7: 0,8 µg GFP, 8 µl Effectene, 6,4 µl Enhancer, 92,8 µl EC- Buffer	Konfluent ca. 40% Vakuolen: - Apoptotische Zellen im Überstand: (+)	Konfluent ca. 40% Vakuolen: (+) Apoptotische Zellen im Überstand: (+)	Konfluent ca. 25% Vakuolen: + Apoptotische Zellen im Überstand: + + +	Fluoreszierende Zellen: + + (ca. 5 %)
Well 8: 0,8 µg GFP, 20 µl Effectene, 6,4 µl Enhancer, 92,8 µl EC- Buffer	Konfluent ca. 35% Vakuolen - Apoptotische Zellen im Überstand: (+)	Konfluent ca. 30% Vakuolen: + + Apoptotische Zellen im Überstand: +	Konfluent ca. 25% Vakuolen: + Apoptotische Zellen im Überstand: + + + +	Fluoreszierende Zellen: -
Well 9: 0,8 µg GFP, 40 µl Effectene, 6,4 µl Enhancer, 92,8 µl EC- Buffer	Konfluent ca. 40% Vakuolen: - Apoptotische Zellen im Überstand: (+)	Konfluent ca. 30% Vakuolen: + Apoptotische Zellen im Überstand: + +	Konfluent ca. 25% Vakuolen: + + + Apoptotische Zellen im Überstand: + + + +	Fluoreszierende Zellen: -
Well 10: 100 µl EC- Buffer 10 µl Effectene	Konfluent ca. 50% Vakuolen: - Apoptotische Zellen im Überstand: (+)	Konfluent ca. 55% Vakuolen: + + Apoptotische Zellen im Überstand: -	Konfluent ca. 60% Vakuolen: + + + Apoptotische Zellen im Überstand: (+)	Fluoreszierende Zellen: -
Well 11: 100 µl EC- Buffer	Konfluent ca. 75% Vakuolen: - Apoptotische Zellen im Überstand: (+)	Konfluent ca. 75% Vakuolen: - Apoptotische Zellen im Überstand: -	Konfluent ca. 90% Vakuolen: - Apoptotische Zellen im Überstand: -	Fluoreszierende Zellen: -
Well 12: Ohne Reagenzien	Konfluent ca. 10% Vakuolen: - Apoptotische Zellen im Überstand: (+)	Konfluent ca. 20% Vakuolen: - Apoptotische Zellen im Überstand: -	Konfluent ca. 30% Vakuolen: - Apoptotische Zellen im Überstand: -	Fluoreszierende Zellen: -

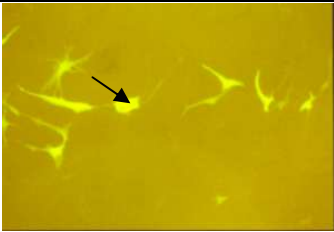
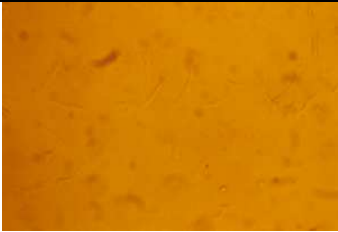
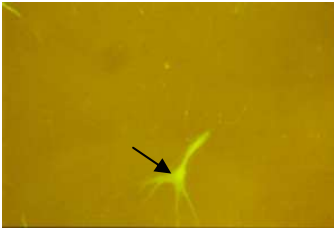
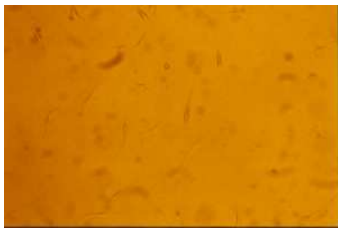
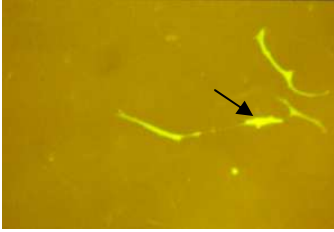
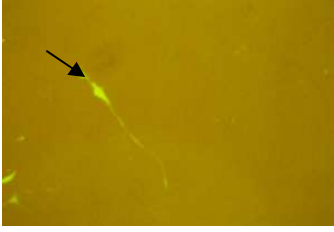
Ergebnisse

3.3. Ergebnis der Transfektion mit Plasmiden und Fugene

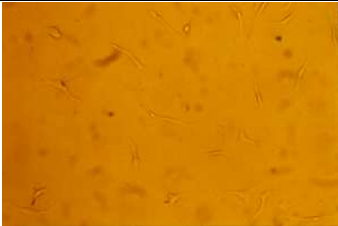
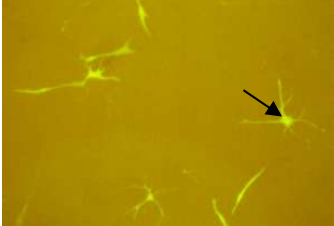
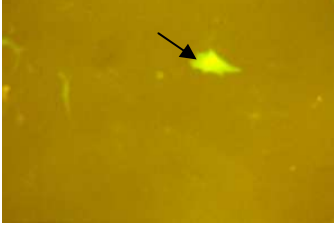
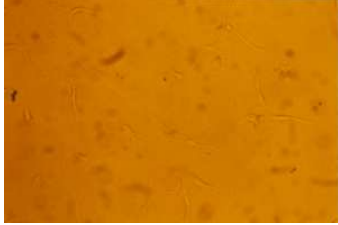
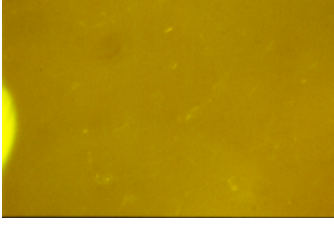
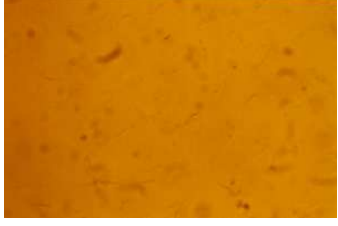
Im Folgenden werden die Ergebnisse der Transfektion mit GFP-Plasmiden und Fugene dargestellt. Hierbei ist jeweils das linke Bild unter Fluoreszenz zum Nachweis der fluoreszierenden (= mit GFP transfizierten) Zellen fotografisch dokumentiert. Das rechte Bild daneben entspricht einer Aufnahme der gleichen Stelle am Objektträger zum Nachweis der Zelldichte. Hieraus konnte nach Evaluation des gesamten Objektträgers eine Transfektionsdichte abgeschätzt werden.

Transfektion vom 26.10.2000 mit Fugene und GFP (RA 68 R):

Tabelle 49: Fotodokumentation der Transfektion mit Fugene und GFP

Well	Fugene:DNA -Verhältnis	Fotodokumentation des Ergebnisses des Well		Geschätzte Transfektions- rate
		Unter Fluoreszenz	Unter Normallicht	
1	3µl Fugene: 1µl DNA			Ca. 5%
				
2	3µl Fugene: 1,5µl DNA			Ca. 5%
				

Ergebnisse

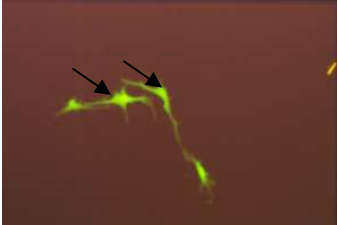
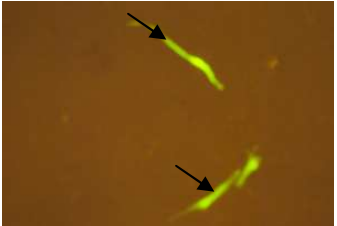
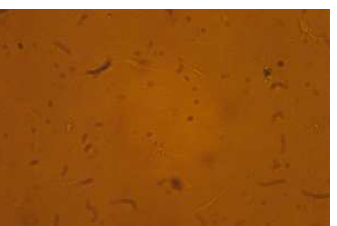
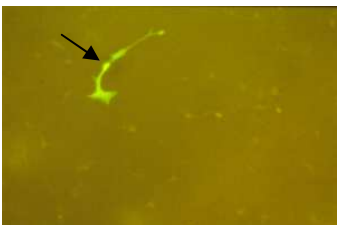
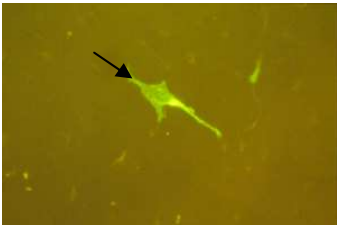
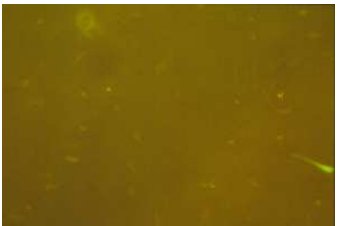
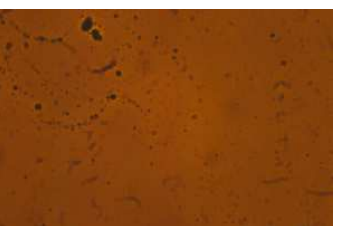
3	3µl Fugene: 2µl DNA	 	Weniger als 5%
4	6µl Fugene: 2µl DNA	 	Mehr als 5%
5	6µl Fugene: 3µl DNA	 	Ca. 10%
6	Nur Medium	 	0%

Bildindex:  Der Pfeil markiert floureszierende Zellen, d.h. Zellen, die erfolgreich transfiziert wurden
Die Bilder unter Normallicht sollen einen Eindruck der Zellrasendichte vermitteln

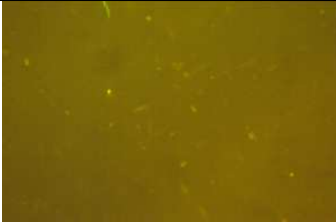
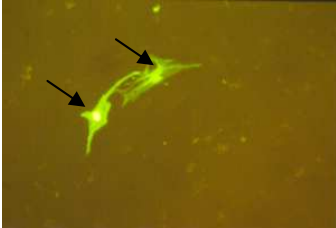
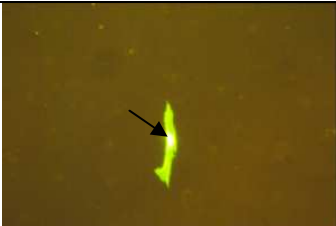
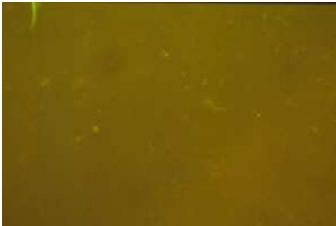
Ergebnisse

Transfektion vom 2.11.2000:

Tabelle 50: Fotodokumentation der Transfektion mit Fugene und GFP

Well	Fugene: DNA-Verhältnis	Fotodokumentation des Ergebnisses des Well	Geschätzte Transfektionsrate
1	3µl Fugene: 1µl DNA	   	Mehr als 5%
2	3µl Fugene: 1,5µl DNA	   	Ca. 5%
3	3µl Fugene: 2µl DNA	   	Weniger als 5%

Ergebnisse

4	6µl Fugene: 2µl DNA	   	Mehr als 5%
5	6µl Fugene: 3µl DNA	   	Weniger als 5 %
6	Nur Medium	 	0%

Bildindex:  Der Pfeil markiert fluoreszierende Zellen, d.h. Zellen, die erfolgreich transfiziert wurden
Die Bilder unter Normallicht sollen einen Eindruck der Zellrasendichte vermitteln

In der ersten Transfektion konnte die höchste Transfektionsrate (ca. 10%) bei einem Fugene/DNA-Verhältnis von 6µl:3 µl erreicht werden. In der zweiten Transfektion lagen die höchsten Transfektionsraten bei einem Fugene/DNA-Verhältnis von 3 µl:1 µl und 6 µl:2 µl vor, erreichten jedoch nur etwas mehr als 5 %.

Ergebnisse

3.4. Ergebnis des Arrays

Transfektion von Fibroblasten (RA 68R) mit Fugene und DNA in unten aufgeführten Mengenverhältnissen gemäß Protokoll (Material und Methoden 2.4.3.3)

Tabelle 51:

Wellnummer	Fugene: DNA-Verhältnis	DNA-Menge und Art	Medium-menge	
Well1	6:2	P33ING antisense 2 µg	94 µl	
Well2	6:2	P33ING sense 2 µg	94 µl	
Well3	6:2	GFP 2 µg	94 µl	Ca. 5% transfiziert
Well4	-	keine	100 µl	

Aus den Wells 1,2, und 4 wurde RNA isoliert, gefällt und wieder aufgenommen.

Ergebnis der Konzentrationsbestimmung auf Ethidiumbromidplatte:

RNA aus Well 1: antisense: 150ng/µl

RNA aus Well 2: sense: 100ng/µl

RNA aus Well 4: Kontrolle: 150ng/µl

Mit 250 ng RNA aus jedem Well auf 5 µl + 5 µl Mix für RT-PCR wurde eine RAP-PCR (Material und Methoden 2.5.5.2) durchgeführt. Mit der erhaltenen radioaktiv markierten cDNA wurde nach Protokoll ein Array durchgeführt.

Hierbei ergab sich das auf den folgenden Array-Membranen dargestellte Ergebnis (Abbildung 39, 40 und 41). Exemplarisch wurden Proteine mit differierender Menge in den Arrays markiert:

E 4: Epidermal growth factor Rezeptor (EGFR)

E 7: Proto-oncogene tyrosine-protein kinase lck, p56-lck, Lymphocyte-specific protein-tyrosine kinase, T-cell-specific protein-tyrosine kinase

F 15: MDM2-like p53-binding protein (MDMX)

M 10: Erythrocyte urea transporter (UTE,UT1), SLC14A1,HUT11, RACH1

Ergebnisse

Abbildung 39: Ergebnis des Array mit cDNA untransfizierter Zellen

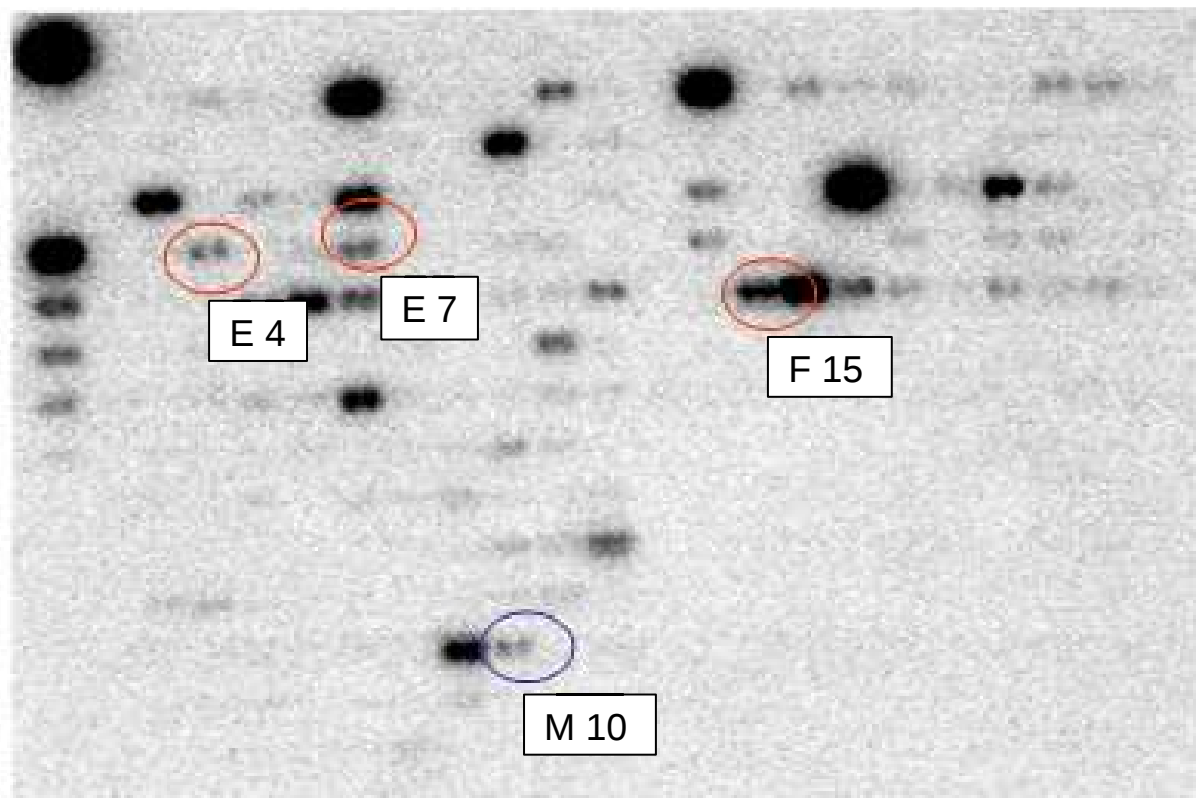
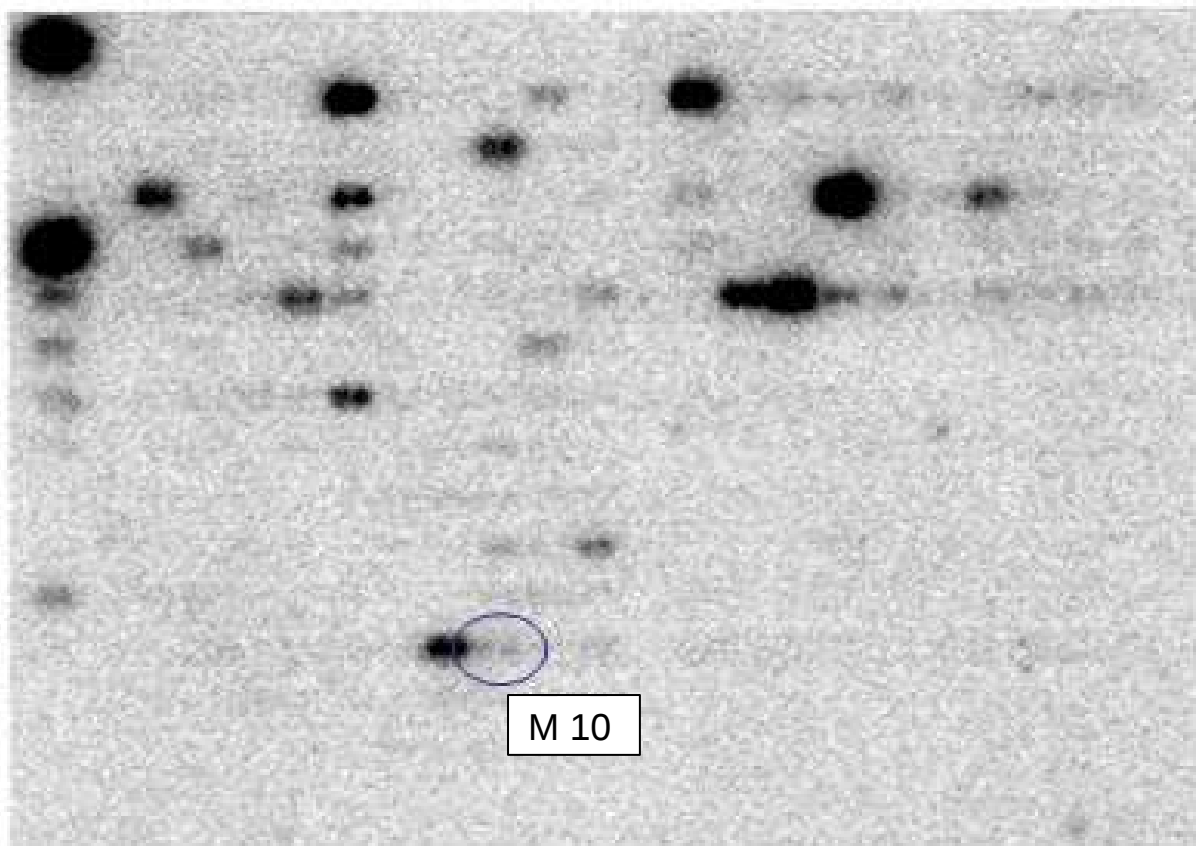
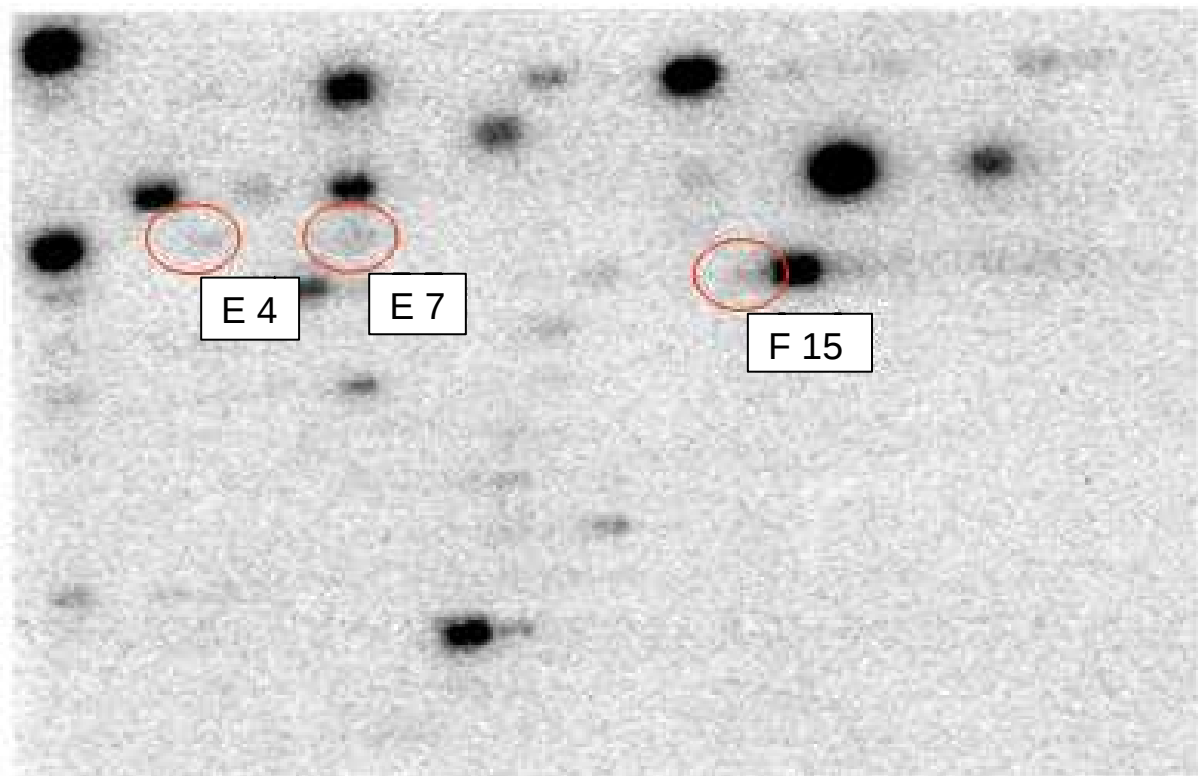


Abbildung 40: Ergebnis des Array mit cDNA p33ING1-„sense“-transfizierter Zellen



Ergebnisse

Abbildung 41: Ergebnis des Array mit cDNA p33ING1-„antisense“-transfizierter Zellen



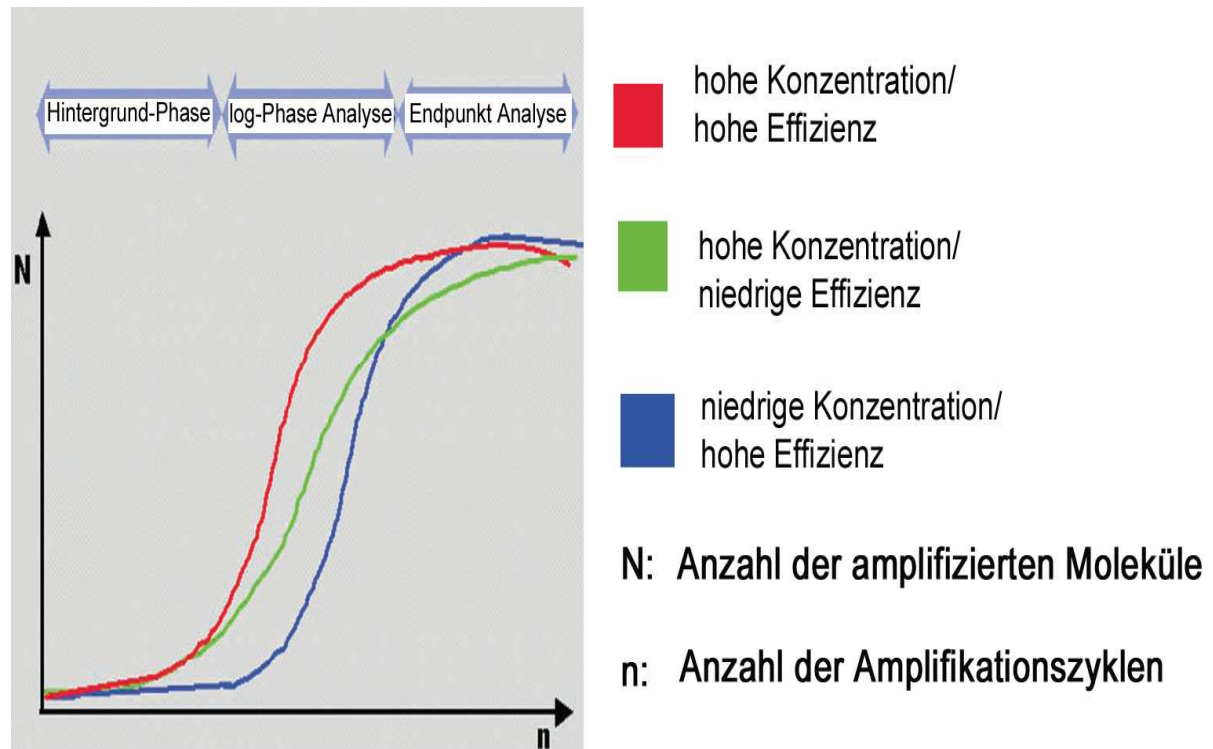
Nach Auswertung mit der Array-Software konnten zwar Unterschiede in den beispielhaft markierten Regionen festgestellt werden, signifikanten Änderungen bei den transfizierten Zellen im Vergleich mit den untransfizierten Zellen ergaben sich jedoch nicht.

Ergebnisse

3.5. Ergebnis der Quantifizierung mittels LightCycler

Folgende Abbildung zeigt den Kurvenverlauf der Auswertung durch die Software nach LightCycler-Amplifikation. Je nach eingesetzter cDNA-Konzentration und PCR-Effizienz kommt es zu unterschiedlichen Kurvenverläufen (Abbildung 42)

Abbildung 42: Kurvenverläufe nach Auswertung von LightCycler Amplifikationen

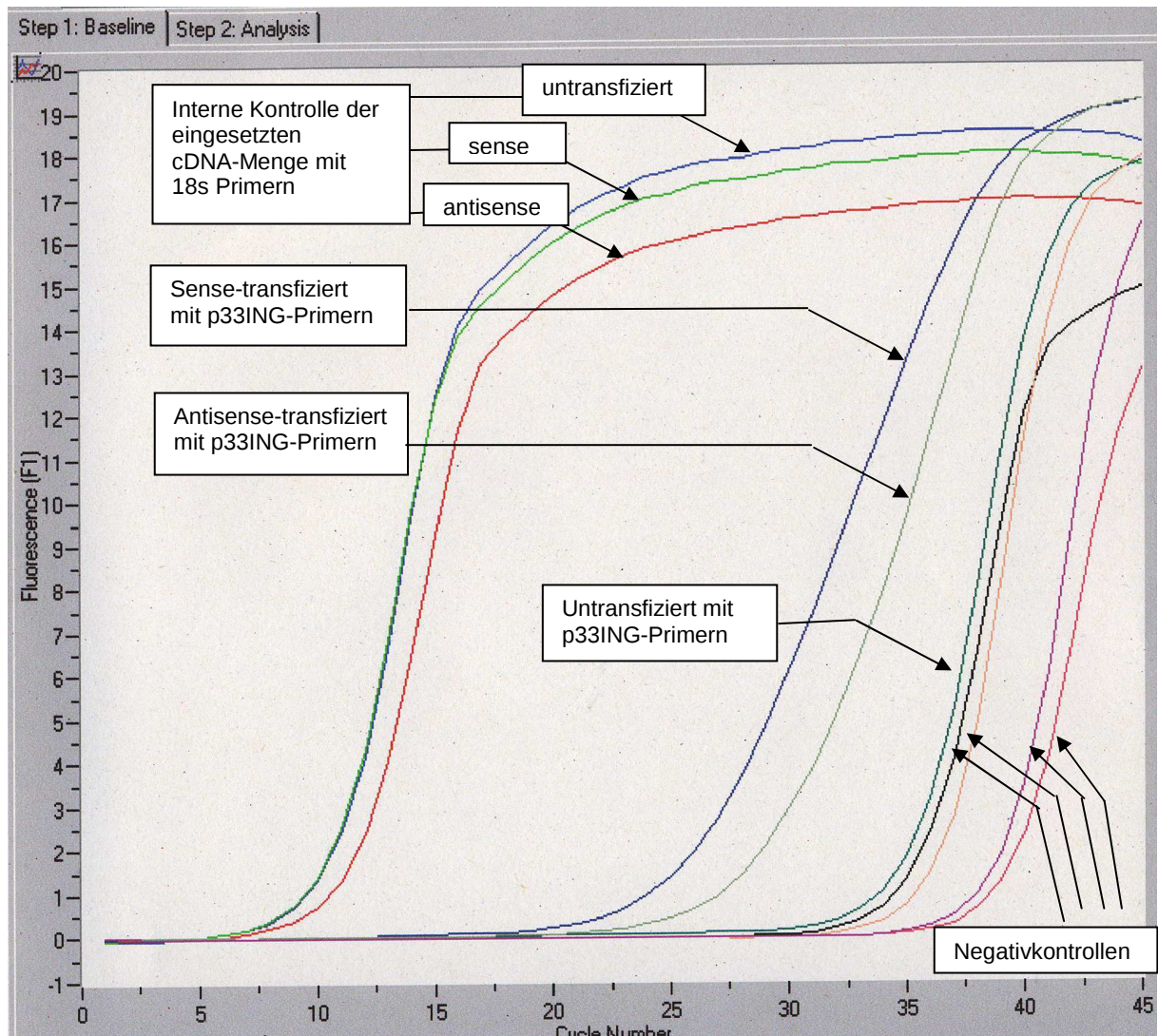


Die folgenden Abbildungen 43 und 44 zeigen die Ergebnisse der Software des LightCycler-Programms nachdem wie in Methoden 2.5.8. beschrieben vorgegangen wurde:

Der flachere Kurvenverlauf und spätere Anstieg der Kurve in die log-Phase spricht für eine geringere Effizienz der p33ING-PCR und für eine niedrigere Konzentration der Ausgangs-cDNA. Die angegebenen Zahlenwerte entsprechen dem sogenannten „Second Derivative Maximum“. Diesen Wert ermittelt die Software automatisch unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Effizienzen. Er entspricht der Anzahl der Amplifikationszyklen, ab der die Fluoreszenz das Hintergrundrauschen übersteigt.

Ergebnisse

Abbildung 43: Kurvenverlauf und automatische Analyse mit „Second Derivative Maximum“



Bildindex [„Second Derivative Maximum“ = erstes Maximum der zweiten Ableitung der Kurve]:

Kurve blau: cDNA untransfizierter Zellen mit 18s-Primern [10,26]

Kurve grün: cDNA „sense“-transfizierter Zellen mit 18s-Primern [10,13]

Kurve rot: cDNA „antisense“-transfizierter Zellen mit 18s-Primern [11,16]

Kurve schwarz: RT mit Wasser mit 18s-Primern [35,16]

Kurve rosa: nur Wasser mit 18s-Primern [39,98]

Kurve dunkelgrün: cDNA untransfizierter Zellen mit p33ING-Primern [35,06]

Kurve dunkelblau: cDNA „sense“-transfizierter Zellen mit p33ING-Primern [26,60]

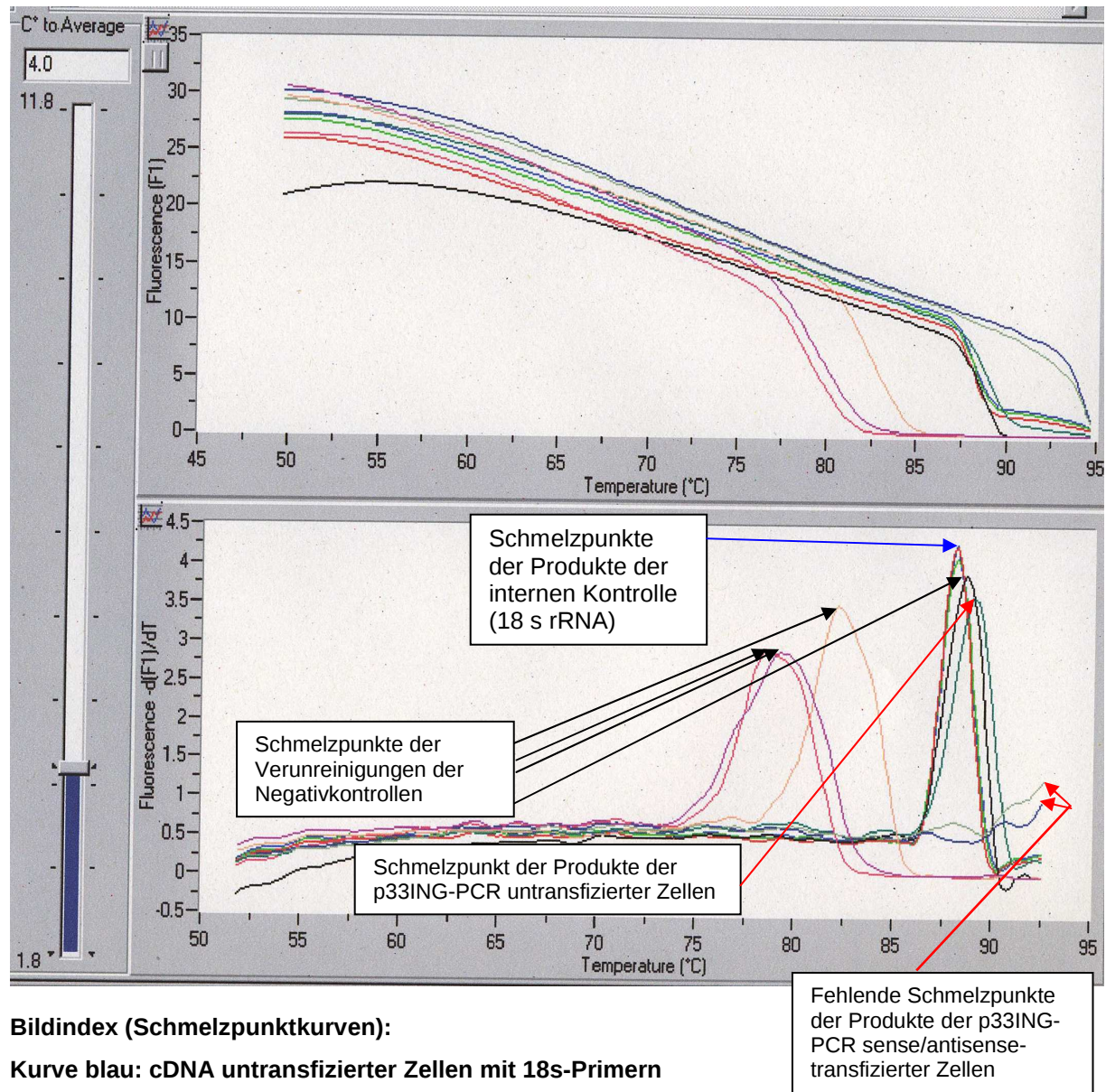
Kurve hellgrün: cDNA „antisense“-transfizierter Zellen mit p33ING-Primern [31,02]

Kurve fleischfarben: RT mit Wasser mit p33ING-Primern [36,06]

Kurve lila: nur Wasser mit p33ING-Primern [38,89]

Ergebnisse

Abbildung 44: Schmelzpunktkurvenanalyse



Bildindex (Schmelzpunktkurven):

Kurve blau: cDNA untransfizierter Zellen mit 18s-Primern

Kurve grün: cDNA „sense“-transfizierter Zellen mit 18s-Primern

Kurve rot: cDNA „antisense“-transfizierte Zellen mit 18s-Primern

Kurve schwarz: RT mit Wasser mit 18s-Primern

Kurve rosa: nur Wasser mit 18s-Primern

Kurve dunkelgrün: cDNA untransfizierter Zellen mit p33ING-Primern

Kurve dunkelblau: cDNA „sense“-transfizierter Zellen mit p33ING-Primern

Kurve hellgrün: cDNA „antisense“-transfizierter Zellen mit p33ING-Primern

Kurve fleischfarben: RT mit Wasser mit p33ING-Primern

Kurve lila: nur Wasser mit p33ING-Primern

Ergebnisse

Die durchgeführten Kontrollen mit 18s-Primern galten als internes Maß der eingesetzten cDNA-Menge. Diese entsprach sich bei einem „Second Derivative Maximum“ von 10,26 und 10,13 bei untransfizierten und mit „sense“-transfizierten Zellen sehr gut. Von „antisense“-transfizierten Zellen wurde nur ca. die Hälfte der cDNA-Menge eingesetzt, da sich hier ein „Second Derivative Maximum“ von 11,16 fand und bei einer exponentiellen Amplifikation ein Zyklus mehr, bis zum Erreichen der gleichen Produktmenge, ca. der Hälfte des eingesetzten Materials entspricht.

Die Werte der untransfizierten Zellen bei der p33ING1-PCR unterscheiden sich nur geringfügig von den Negativkontrollen. „Sense“- und „antisense“-transfizierte Zellen zeigen mit 26,60 und 31,02 ein deutlich niedrigeres „Second Derivative Maximum“. Die Bewertung dieser Kurve ist jedoch äußerst kritisch anzusehen, da zum einen die Negativkontrollen keinen Nulllinienverlauf zeigen und wahrscheinlich aufgrund von Verunreinigungen ebenfalls cDNA amplifiziert wurde, zum anderen in der Schmelzkurve bei den sense- und antisense-transfizierten Zellen mit p33ING-Primern-PCR keine Schmelzpunkte erscheinen. Diese sollten sich jedoch nicht von den Schmelzpunkten der Produkte der p33ING1-PCR untransfizierter Zellen unterscheiden.

V. DISKUSSION

Veränderungen in Synovialzellen, unter anderem die vermehrte Produktion von Wachstumsfaktoren und Matrix-degradierenden Enzymen, sowie die vermehrte Expression von Proto-Onkogenen, tragen zur progressiven Destruktion der betroffenen Gelenke in der RA bei. Bisher ist jedoch noch zu wenig über die molekularen Grundlagen in Bezug auf den aggressiven Phänotyp synovialer Fibroblasten von Patienten mit RA bekannt. Es wurde daher versucht, synoviale Fibroblasten nonviral zu transfizieren und in deren Proteinsynthese mittels antisense-Verfahren regulierend einzugreifen. Dies wurde anhand von IL-6, einem wichtigen proinflammatorischen Zytokin, und anhand von p33ING1, einem Tumor-Supressor-Gen versucht. So bestand die Möglichkeit zum einen in die Vermittlung von Entzündungsreaktionen einzugreifen und zum anderen Proliferations- und Wachstumsregulation synovialer Fibroblasten zu beeinflussen. Da Entzündung und gestörte Apoptose als zwei wichtige Faktoren in der Pathogenese der RA angesehen werden, ergab sich hiermit auf zwei Ebenen ein genregulatorischer Ansatz. Dies wäre Voraussetzung für eine spätere Entwicklung eines gentherapeutischen Medikaments.

1. Diskussion der Methoden

1.1. Diskussion der Methoden zur Entwicklung von Plasmiden

Das Einbringen fremder DNA-Stücke in Plasmide über „sticky ends“ und die anschließende Vermehrung in Bakterien und Isolierung der Plasmid-DNA ist eine weit verbreitete und etablierte gentechnische Methode.

In der vorliegenden Arbeit wurden Teile der codierenden Genabschnitte von IL-6 und p33ING1 in die Plasmide eingebracht, da mittels antisense-RNA die Translation der mRNA der beiden Proteine gehemmt werden sollte. Als Kontrolle wurde sense-RNA benutzt um Transfektions- und modifizierte-Plasmideinflüsse zu mitteln. Daher wurden die Genabschnitte in unterschiedlichen Richtungen in die Plasmide eingebaut.

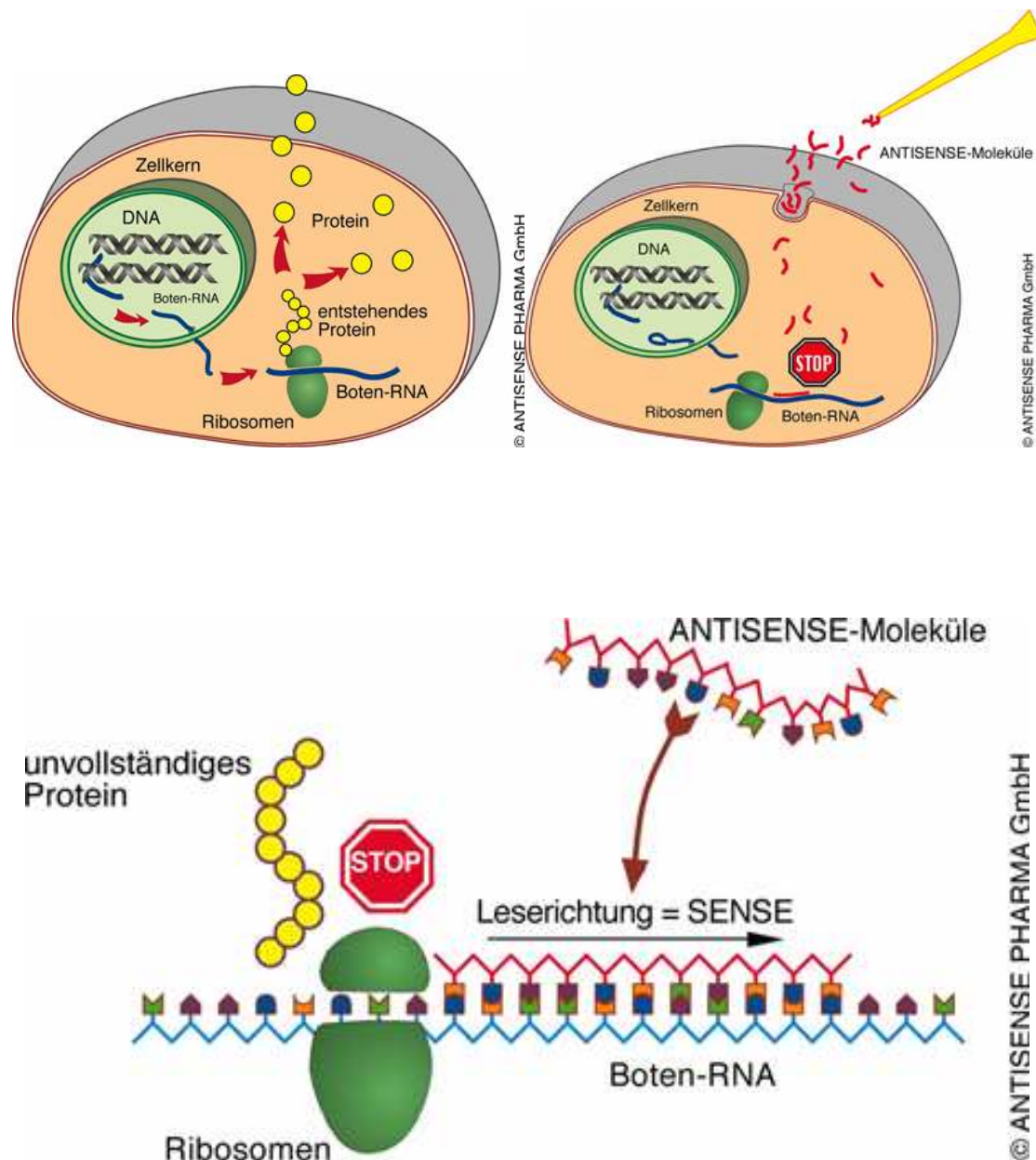
Die Antisense-RNA (aRNA) ist eine einzelsträngige RNA, die komplementär zur Messenger-RNA (mRNA) ist. Die mRNA wird vom nicht-kodierenden Strang

Diskussion

(codogener Strang) der DNA transkribiert. Wird auch der komplementäre Strang transkribiert, entsteht eine zur mRNA komplementäre aRNA. Die aRNA inhibiert durch Basenpaarung mit der komplementären mRNA dessen Translation in der Zelle. Damit wird die Genexpression einzelner Gene reguliert.

Antisense-RNA stellt daher eine natürliche und gentechnische Möglichkeit der Genregulation der Proteinbiosynthese dar (Abbildung 45).

Abbildung 45: Prinzip der Antisense-Methode; Antisense Pharma GmbH



Dieses Prinzip wird mittlerweile auch bei der medikamentösen Therapie bestimmter Erkrankungen erprobt. So befindet sich zur Zeit z.B. das antisense-Produkt AP

Diskussion

12009, das die Bildung von TGF-beta2 hemmt, in klinischen Phase IIb-Studien zur Therapie des hochgradigen Gliom. (Schliengensiepen et al. 2008)

Um eine Expression in Fibroblasten zu erreichen wurde der gewünschte Bereich aus den geklonten Plasmiden des TOPO-Vektors mittels Restriktionsenzymen ausgeschnitten und in den pcDNA3.1-Vektor ligiert. Dieser besitzt einen CMV-Promotor zur Expression in Säugetierzellen.

Da sich im vorliegenden Fall die IL-6 DNA nur in einer Ausrichtung in den pcDNA3.1-Vektor integrierte, war eine Modifikation der Methode nötig. Es wurde versucht, mit einer Primerverlängerung um die Schnittstellen von BamH1 und Eco R5, PCR-Produkte zu erzeugen, die sich nur in einer bestimmten Richtung in den Vektor integrieren können.

1.2. Diskussion der Methoden zur RNA-Sondenherstellung

Bei der Herstellung von RNA-Sonden besteht grundsätzlich die Möglichkeit, diese von einem Vektor zu transkribieren, in dem der gewünschte DNA-Abschnitt von den entsprechenden Promotoren für die RNA-Polymerase flankiert ist oder direkt vom PCR-Produkt, das um die Sequenz des entsprechenden Promotors verlängert wurde. Da in unserem Fall die Vektoren auch für die Transfektion benötigt wurden, entschieden wir uns für diese Variante. Aufgrund der ubiquitär vorkommenden RNAsen muß hierbei besonders sorgfältig gearbeitet werden. Um sense- und antisense-RNA-Sonden zu erzeugen, wurde (entsprechend der Vektorkarte des pCRII-TOPO-Vektors) einmal mit der entsprechenden Polymerase RNA von der Stelle des T7-Promotors bis zur Schnittstelle von BamH1 transkribiert, das andere Mal vom SP6-Promotor bis zur Schnittstelle von Eco R5, nachdem zuvor der Vektor mit dem entsprechenden Restriktionsenzym linearisiert wurde. Diese Linearisierung verhindert, daß ein längerer Teil des Vektors transkribiert wird, was die Spezifität verschlechtern würde. Zur Stabilisierung der Sonden wurde Glykogen und RNase-Inhibitor zugegeben. Um den Einbau der Sonden in die Zelle nachweisen zu können, wurden diese mit Digoxigenin markiertem UTP hergestellt.

Diskussion

1.3. Diskussion der Methode der nonviralen Transfektion

1.3.1. Diskussion der nonviralen Transfektion mit RNA

Es wurde versucht mittels Lipofektion direkt RNA-Sonden (sense, antisense und Doppelstrang) in synoviale Fibroblasten einzubringen und die Auswirkungen auf die Proteinsynthese mittels IL-6-ELISA nachzuweisen.

Hierbei war mit folgenden Problemen zu rechnen:

Bildet die RNA mit Effectene stabile Komplexe, um in die Zelle integriert zu werden?

Um dies nachzuweisen, wurde die Transfektion mit Digoxigenin markierten RNA-Sonden durchgeführt und eine Digoxigenin-AP-AK-Färbung angeschlossen.

Während sich bei sense- und antisense-Transfektionen lediglich vereinzelte Präzipitate zeigten, konnte bei Doppelstrang-RNA-Transfektionen eine deutlich höhere Transfektionsrate erreicht werden, was wohl am ehesten daran liegt, daß Effectene zur Transfektion von DNA entwickelt wurde und die Doppelstrang-RNA stabiler sein dürfte.

Ist die RNA in der Zelle so stabil, daß ein Effekt auf die Proteinsynthese erreicht werden kann und wie lange hält dieser Effekt an?

Um dies nachzuweisen, wurde ein IL-6 ELISA der Überstände vor Transfektion und nach 24, 48 und 72 h durchgeführt. Hierbei fanden sich keine Ergebnisse die einen stabilen Effekt auf die Proteinsynthese nahe legen würden. Außerdem waren in den mikroskopischen Kontrollen nach 48 h keine Präzipitate mehr nachweisbar, was gegen eine stabile Transfektion spricht.

1.3.2. Diskussion der nonviralen Transfektion von Plasmiden

Auf dem Gebiet der nonviralen Transfektion wurde die letzten Jahre viel geforscht, da diese Verfahren gegenüber der viralen Transfektion für den therapeutischen Einsatz entscheidende Vorteile hat.

Die nonviralen Vektoren sind deutlich weniger immunogen, können sich nicht in das Genom der Zelle integrieren und dadurch unerwünschte Mutationen auslösen. Virale Vektoren behalten in vielen Fällen bestimmte Charakteristika des Wildtyp-Virus und können entsprechende unerwünschte Nebenwirkungen verursachen. (Jacobsen et al. 2006, Mah et al. 2002, Weiss et al. 1999)

Es ist jedoch bekannt, daß nonvirale Verfahren in hoher Dosierung einen stark schädigenden Streß für die Zellen darstellen und daher sorgfältig optimiert werden

Diskussion

müssen, u.a. das Verhältnis Transfektionsreagenz/DNA, die Konzentration der Komplexe und die Inkubationsdauer. (Weiss et al. 1999) Außerdem ist die Transfektionsrate von der Art der Zelle abhängig, da es bekanntermaßen gut und insuffizient (Hämatopoetische Zellen z.B. Megakaryozyten) zu transfizierende Zellen gibt. (Isakari et al. 2007)

Die Transfektionsraten liegen im Vergleich zur viralen Transfektion jedoch generell deutlich niedriger. Für humane Fibroblasten ist eine Transfektionsrate von ca. 10% beschrieben. (Jacobsen et al. 2006)

2. Diskussion der Ergebnisse

2.1. Diskussion der Ergebnisse zur Plasmidherstellung

Mittels PCR konnten die gewünschten DNA-Abschnitte von IL-6 und p33ING1 vervielfältigt werden. Anschließend wurden sie in den pCR II-TopoVektor eingebracht und kloniert. Der Plasmidverdau erbrachte keinen eindeutigen Beweis für den Einbau in den Vektor, so daß eine M13-PCR angeschlossen wurde. In dieser konnten die erwarteten DNA-Abschnitte vervielfältigt werden, allerdings fand sich auch in dem Plasmid einer blauen Bakterienkultur (Negativkontrolle) das Insert von IL-6.

Von den positiv nachgewiesenen IL-6-4, IL-6-6, p33ING-4 und p33ING-6 wurde eine größere Menge Plasmid hergestellt. Die Plasmide konnten elektrophoretisch nachgewiesen werden und wurden sequenziert. Hier fand sich in allen Plasmiden das erwartete Insert, wobei in p33ING4 eine Base von 380 Basen falsch kodiert war, bei den anderen Plasmiden stimmten alle Basen mit der gewünschten Sequenz überein.

In der anschließend durchgeführten M13/forward bzw. reverse Primer-PCR mit Bakterien stellte sich heraus, daß die IL-6 PCR-Produkte alle in eine Richtung eingebaut waren. Bei den p33ING1-Plasmiden fand sich eine Kolonie die das PCR-Produkt in gegensinniger Richtung in Vergleich zu den anderen getesteten Bakterien eingebaut hatte.

Aus diesem Grund wurden IL-6-4 und IL-6-6 mit EcoR1 verdaut, um so einen Einbau in den pcDNA3.1-Vektor in beide Richtungen zu ermöglichen. Die Plasmide p33ING-4 und p33ING-6 wurden mit EcoR5 und BamH1 verdaut, um ihnen nur eine Möglichkeit zum Einbau in den pcDNA3.1-Vektor zu geben und so sicher sense und antisense produzierenden Plasmide zu erhalten.

Diskussion

Trotz nicht sicher beurteilbarer Ligation enthielten alle angesetzten Flüssigkulturen Plasmide. Im durchgeführten Verdau zeigte sich dann jedoch, dass nur die p33ING1 Inserts eingebaut wurden.

Für den Einbau der IL-6 Inserts wurde eine neue Strategie entwickelt: Die forward und reverse-Primer für IL-6 wurden um die Schnittstellen von BamH1 oder EcoR5 verlängert und umgekehrt. Nach zwei PCR-Ansätzen erhielt man entweder Produkte, die am 3'-Ende mit Bam H1 und am 5'-Ende mit EcoR5 geschnitten werden konnten, oder welche, die am 5'-Ende mit BamH1 und am 3'-Ende mit EcoR5 geschnitten werden konnten. Damit ergab sich auch für diese Produkte nur eine mögliche Direktion zum Einbau in den Vektor nach Verdau mit EcoR5 und BamH1. Mittels PCR konnten in allen untersuchten Bakterienkolonien entsprechende Inserts nachgewiesen werden.

Bei der Sequenzierung fand sich jedoch nur in einer Bakterienkolonie ein Insert, das der PCR mit IL-6 Bam und IL-6 Eco entsprach und in einer weiteren Bakterienkolonie ein Insert, das der PCR mit IL-6 Eco R und IL-6 Bam R entsprach. Mit diesen Plasmiden wurde weiter gearbeitet.

Bei den p33ING1-Plasmiden wurde mit den p33ING-6-2 weitergearbeitet. Da bei p33ING-4 eine Base nicht korrekt war, wurde hier p33ING-3 verwendet, bei dem auch nach dem Einbau in den pcDNA-Vektor in der Flüssigkultur eine korrekte Sequenz nachgewiesen werden konnte. Für die weitere Arbeit wurde p33ING-3-1 verwendet.

2.2. Diskussion der Ergebnisse zur RNA-Sondenherstellung

Zur Herstellung der sense- und antisense-RNA-Sonden wurde der Vektor mit dem entsprechenden Restriktionsenzym linearisiert und der zugehörigen RNA-Polymerase transkribiert. Aus ungeklärtem Grund fanden sich am Agarosegel Banden auf Höhe der 500 BP- und 300 BP-Markierung. Erwartet wurden Banden von ca. 500 Basenpaaren. Für ein Transkript vom Vektor ohne Insert waren 300 BP zu lang.

Zum Nachweis der Transfektion wurden Sonden mit Digoxigenin-gelabeltem-UTP hergestellt.

Diskussion

2.3. Diskussion der Ergebnisse der Transfektion mit RNA-Sonden

In der Digoxigenin-AP-AK-Färbung zeigten sich lediglich in den Transfektionen mit Doppelstrang-RNA nach 24 h deutliche Präzipitate. Die Tatsache, daß lediglich Doppelstrang-RNA zu einer befriedigenden Transfektionsrate führte, lässt sich evtl. dadurch erklären, daß Effectene eigentlich zur Transfektion mit DNA entwickelt wurde und vielleicht mit der Einzelstrang-RNA keine adäquaten Präzipitate formen kann. Das Ausbleiben einer Färbung nach 48 h hängt vielleicht mit der Instabilität der RNA zusammen, kann aber auch ein generelles Transfektionsproblem sein.

Auch im ELISA ließ sich keine schlüssige Erklärung auf die Auswirkungen auf die Proteinsynthese finden. Zwar fand sich in der Transfektion mit 250 µg RNA der stärkste Abfall, in dem mit antisense-RNA transfizierten Well 2, dies konnte jedoch bei Transfektion mit 100µg RNA nicht bestätigt werden. Die niedrigsten Werte nach 24 h könnten mit der Instabilität der RNA zusammenhängen. Da die Negativkontrollen jedoch das gleiche Verhalten zeigen, ist eher davon auszugehen, daß es mit dem Austausch des Mediums nach der Inkubationszeit zusammenhängt.

Die niedrigeren Werte in der IL-6-Produktion der untransfizierten Zellen in einem Experiment, ließen sich im zweiten Experiment nicht reproduzieren. In Zusammenschau mit der niedrigen Transfektionsrate und dem fehlenden Unterschied zwischen „sense“ und „antisense“ ist also nicht von transfektionsbedingten Effekten auszugehen. Da RNA wohl zum Erreichen länger wirkender Effekte auf die Zelle zu instabil ist und keine geeignete Transfektionsmethode zur Verfügung stand, wurde die Transfektion mit RNA zugunsten der Transfektion mit Plasmiden verlassen.

2.4. Diskussion der Ergebnisse der Transfektion mit Plasmiden

In den transfizierten Zellen fand sich über 3 Tage in allen Zellen, die mit Plasmid-DNA transfiziert wurden, ein Rückgang der Zellzahl. Nur die untransfizierten Zellen zeigten einen Anstieg oder zumindest eine Konstanz in der Zellzahl. Diese Beobachtung kann evtl. mit der zytotoxischen Wirkung nonviraler Transfektion erklärt werden. Zwischen sense- und antisense-Plasmid-Transfektion konnte keine einheitliche, differierende Tendenz im Zellwachstum nachgewiesen werden.

Im cDNA-Array konnte nach Transfektion mit sense- und antisense-Plasmid keine wesentliche Veränderungen in der Genexpression nachgewiesen werden, was am

Diskussion

ehosten an den niedrigen Transfektionsraten liegt, da ganz erhebliche Unterschiede durch die Inhibierung von p33ING1 erreicht werden müssten, um bei einer durchschnittlichen Transfektionsrate von 5-10% noch nachweisbar zu sein. Auch im LightCycler-Experiment gelang kein Nachweis einer veränderten Proteinsynthese. In diesem Fall kam es auch zu einer Verunreinigung der PCR-Ansätze, so dass eine Auswertung nicht möglich war.

Zum Nachweis einer effizienten Transfektion und zur Optimierung der Transfektion wurde mit GFP-Plasmiden transfiziert. Hier ließ sich zwar durch eindeutige Fluoreszenz, die prinzipielle Möglichkeit der nonviralen Transfektion nachweisen, es konnten jedoch keine wirklich befriedigenden Transfektionsraten erzielt werden. Diese lagen bei anderen Zellreihen in unserem Labor zum Teil deutlich höher. Die unterschiedlich gute Transfektionsfähigkeit von Zellen ist vielfach beschrieben. Möglicherweise spielt hier auch die veränderte Genexpression von Fibroblasten von Patienten mit rheumathoider Arthritis eine Rolle.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht mittels nonviraler Transfektion von antisense-RNA produzierenden Plasmiden oder antisense-RNA-Sonden in die Proteinsynthese synovialer Fibroblasten von RA-Patienten in vitro einzugreifen, um so die Voraussetzung für einen späteren gentherapeutischen Ansatz zu schaffen. Hierzu wurden Plasmide entwickelt, die sense- oder antisense-RNA von IL-6 oder p33ING1 produzieren konnten. Anschließend wurde versucht, diese mittels unterschiedlicher Transfektionsreagenzien in synoviale Fibroblasten zu transfizieren. Da sich in den entsprechenden Nachweismethoden (IL-6 Elisa, cDNA-Array, LightCycler) keine signifikanten Änderungen der Proteinproduktion bzw. Genexpression nachweisen ließen, wurde auf eine Transfektion mit GFP-Plasmiden gewechselt, um die Transfektionsraten nachweisen und optimieren zu können. Hierbei konnten unter den günstigsten Bedingungen Transfektionsraten von ca 5-10% erreicht werden. Dies entspricht in etwa anderen publizierten Transfektionsraten von Fibroblasten (Jacobsen et al. 2006). Für den in vitro-Gebrauch ist aber die virale Transfektion die deutlich effizientere Methode zur Transfektion von synovialen Fibroblasten mit Transfektionsraten bis zu 90% bei adenoviraler Transfektion (Judex 2001). Zusammengefaßt ist die Transfektion von RA-Fibroblasten mit Zielgenen trotz ihrer Heterogenität möglich. Die verschiedenen Transfektionstechniken weisen aber hohe Unterschiede in ihrer Effizienz auf.

VI. Abstract

In the present experimental approach, we tried to alter the protein synthesis of synovial fibroblasts from patients with rheumatoid arthritis (RA) by transfecting antisense-RNA-producing-plasmids and antisense-RNA by nonviral methods, in order to facilitate the development of gene therapeutic strategies in the future.

Specifically, we developed plasmids that were able to code for IL-6- or p33ING1-sense- or antisense-RNA and transfected synovial fibroblast using different transfection reagents.

Because of the low yield reflected by an unchanged protein production/gene expression as measured with different detection methods (IL-6-ELISA, cDNA-Array, Lightcycler), we changed the transfection protocol by using GFP-Plasmids in order to optimize the rate of transfected cells.

Herewith, after optimizing the transfection conditions, transfection rates up to 5-10% could be achieved, which is according to the results of other published transfection rates of fibroblasts. In addition, viral transfection revealed to be the most effective method in vitro for transfecting synovial fibroblasts with transfection rates up to 90% when using adenoviruses.

In summary, effective transfection of RA synovial fibroblasts with different genes-of-interest is feasible, but the different transfection methods vary considerably with respect to their effectivity.

VII. ABKÜRZUNGEN

Ak	Antikörper
AMV	„avian myeloblastosis virus“
APZ	Antigen-präsentierende Zellen
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	„bovine serum albumin“ (Rinder Serum Albumin)
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
cm	Zentimeter
CMV	„Cytomegalie-Virus“
CTP	Cytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	„Desoxyribonucleic acid“ (Desoxyribonukleinsäure)
dATP	2'-Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat
dCTP	2'-Desoxy-Cytidin-5'-Triphosphat
dGTP	2'-Desoxy-Guanosin-5'-Triphosphat
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
dTTP	2'-Desoxy-Thymidin-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	„epidermal growth factor“
ELISA	„enzyme-linked-immunosorbent-assay“
FCS	„fetal calf serum“ (fötales Kälberserum)
FGF	„fibroblast growth factor“
g	Gramm
GM-CSF	„granulocyte macrophage colony stimulating factor“

Abkürzungen

GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n) („hours“)
H ₂ O _{bidest}	Zweifach destilliertes Wasser
ICAM	„intercellular adhesion molecule“
IGF	„insulin-like growth factor“
IL	Interleukin
IL-1Ra	Interleukin-1 Rezeptorantagonist
kg	Kilogramm
M-CSF	„macrophage colony stimulating factor“
MHC	„major histocompatibility complex“
min	Minute(n)
ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
mm	Millimeter
MMLV	„Moloney murine leukemia virus“
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MOI	„multiplicity of infection“
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
nm	Nanometer
OA	Osteoarthritis
PBMC	„peripheral blood monocyctic cells“
PBS	„Phosphate buffered salt solution“ (phosphatgepufferte Salzlösung)
PDGF	„platelet derived growth factor“
PCR	„polymerase chain reaction“ (Polymerase Kettenreaktion)
RA	Rheumatoide Arthritis
RAP-PCR	„RNA arbitrarily primed PCR“

Abkürzungen

RNA	Ribonukleinsäure („ribonucleic acid“)
aRNA	antisense-RNA
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure („messenger-RNA“)
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
SD	Standardabweichung
SDS	„sodium dodecyl sulfate“ (Natriumdodecylsulfat)
sek	Sekunde(n)
sTNF RI	löslicher („soluble“) Tumor-Nekrose Faktor Rezeptor I
T _{ann}	Primerbindungs-Temperatur („annealing“)
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TGF	„transforming growth factor“
TIMP	„tissue inhibitor of metalloproteinases“
TNF	Tumor-Nekrose Faktor
TNFR	Tumor-Nekrose Faktor Rezeptor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTP	Thymidintriphosphat
upm	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uraciltriphosphat
VCAM-1	„vascular cell adhesion molecule-1„
X-Gal	5–Bromo–4–Chloro–3–Indolyl-β-D ⁻ Galactopyranosid
ZKF	Zellkultur-Flaschen

Referenzen

VIII. REFERENZEN

- Campos,E.I., Chin M.Y., Kuo W.H., Li,G.: *Biological functions of the ING family tumor supressors. Cell Mol Life Sci* 2004. 61, 2597-2613.
- Choy,E.: *Clinical experience with inhibition of interleukin-6. Rheum Dis Clin North Am* 2004. 30, 405-415
- Dingle,J.T.: *Heberden oration 1978. Recent studies on the control of joint damage: the contribution of the Strangeways Research Laboratory. Ann Rheum Dis* 1979. 38, 201-214.
- Egerer,K., Feist,E.,Burmester,G.R.: *Serologische Diagnostik der rheumatoiden Arthritis: Antikörper gegen citrullinierte Antigene. Dtsch Ärztebl Int* 2009, 106(10), 159-163
- Firestein,G.S., Nguyen,K., Aupperle,K.R., Yeo,M., Boyle,D.L., and Zvaifler,N.J.: *Apoptosis in rheumatoid arthritis: p53 overexpression in rheumatoid arthritis synovium. Am J Pathol* 1996. 149, 2143-2151.
- Firestein,G.S.: *Rheumatoid synovitis and pannus. Rheumatology (ed by Klippel JH & Dieppe PA)* 1998. 5.13.1-5.13.24, Mosby, London.
- Fujimoto,M., Serada,S., Mihara,M., et al.: *IL-6 blockade supresses autoimmune arthritis in mice by the inhibition of inflammatory TH 17 responses, Arthritis and Rheumatism* 2008, 58, 3710-3719
- Gaffen,SL.: *The role of Interleukin-17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Curr rheumatology reports* 2009. Vol 11(5), 365-370
- Garkavtsev,I., Demetrick,D., Riabowol,K.: *Cellular localization and chromosome mapping of a novel candidate tumor supressor gene (ING1). Cytogenet Cell Genet* 1997a. 76, 176-178.
- Garkavtsev,I., Riabowol,K.: *Extension of the replicative life span of human diploid fibroblasts by inhibition of the p33ING1 candidate tumor supressor. Mol CellBiol* 1997b. 17, 2014-2019.
- Gay,S., Gay,R.E., and Koopman,W.J.: *Molecular and cellular mechanisms of joint destruction in rheumatoid arthritis: two cellular mechanisms explain joint destruction? Ann Rheum Dis* 1993. 52 Suppl 1, S39-S47.
- Goeman,F., Thormeyer,D., Abad,M., Serrano,M., Schmidt,O., Palmero,I., Baniahmad,A.: *Growth inhibition by the tumor supressor p33ING1 in immortalized and primary cells: involvement of two silencing domains and effect of Ras. Mol Cell Biol* 2005. 25, 422-431.
- Gong, W., Russell,M., Suzuki,K., Riabowol,K.: *Subcellular targeting of p33ING1b by phosphorylation-dependent 14-3-3 binding regulates p21WAF1 expression. Mol Cell Biol* 2006. 26, 2947-2954.
- Isakari,Y., Harada,Y., Ishikawa,D., Matsumura-Takeda,K., Sogo,S., Ishida,T., Taki,T., Kiwada,H.: *Efficient gene expression in megakaryocytic cell line using nucleofection. Int J Pharm* 2007. 338, 157-164.
- Jacobsen,F., Mertens-Rill,J., Beller,J., Steinstraesser,L.: *Nucleofection: A New Method for Cutaneous Gene Transfer? J Biomed Biotechnol.* 2006. 26060

Referenzen

- Jana SS, Kawamoto S, Adelstein RS: *A specific isoform of non muscle myosin II-C is required for cytokinesis in a tumor cell line. J Biol Chem* 2006. 34, 24662-24670
- Judex M., Neumann E., Fleck M., Pap T., Mountz J.D., Gay R.E., Schölmerich J., Nishioka K., Gay S., Müller-Ladner U. "Inverse wrap" – an improved implantation technique for virus-transduced synovial fibroblasts in the SCID-mouse model for RA. *Mod Rheumatol* 2001. 11, 145-150.
- Jung R, Soondrum K, et al.: *Quantitative PCR. Clin Chem Lab Med* 2000. 38, 833-836
- Kataoka,H., Bonnefin,P., Vieyra,D., Feng,X., Hara,Y., Miura,Y., Joh,T., Nakabayashi,H., Vaziri,H., Harris,CC., Riabowol,K.: *ING1 represses transcription by direct DNA binding and through effects on p53. Cancer Res* 2003. 63, 5785-5792.
- Klareskog L., Catrina AL., Paget S.: *Rheumatoid arthritis. Lancet* 2009. Feb 21,373(9664):659-672
- Lefevre S., Knedla A., Tennie C., Kampmann A., Wunrau C., Dinser R., Korb A., Schnäker E.M., Tarner I.H., Robbins P.D., Evans C.H., et al.: *Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. Nat. Med* 2009. Nov 8
- Li WX, Li H, Lu R, Li F, Dus M, Atkinson P, Brydon EW, Johnson KL, García-Sastre A, Ball LA, Palese P, Ding SW.: *Interferon antagonist proteins of influenza and vaccinia viruses are suppressors of RNA silencing.Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2004. 5, 1350-1355.
- Mah, C., Byrne, BJ., Flotte, TR.:*Virus-based gene delivery systems. Clin Pharmacokinetics* 2002. 41, 901-911.
- Neumann, E.: *Untersuchung von gentherapeutischen Ansätzen für die rheumatoide Arthritis anhand des SCID-Maus-Modells. Regensburg* 2001
- Paleolog,E.M.: *Angiogenesis: a critical process in the pathogenesis of RA--a role for VEGF? Br J Rheumatol* 1996. 35, 917-919.
- Rasmussen R.: Quantification on the LightCycler. in Meuer S, et al.: *Rapid cycle real-time PCR, Springer, Heidelberg* 2001, 21-35
- Schliengensiepen K.H., Fischer-Blass B., Schmaus S., Ludwig S.: *Antisense therapeutics for tumor treatment: The TGF-beta2 inhibitor AP 12009 in clinical development against malignant tumors. Recent results in cancer research* 2008. Vol 177; 137-150
- Schutzbank TE, Stern HJ.: *Principles and application of the polymerase chain reaction. J Int Fed Clin Chem* 1993. 5, 96-105.
- Shuman S.: *Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. J Biol Chem* 1994. 269, 32678-32684.
- Templeton, NS.: *The polymerase chain reaction. History, methods and applications. Diagn Mol Pathol* 1992.1, 58-72.
- Tsang,F.C., Po,L.S., Leung,K.M., Lau,A., Siu,W.Y., Poon,R.Y.: *ING1b decreases cell proliferation through p53-dependent and independent mechanisms. FEBS Lett* 2003. 553, 277-285.

Referenzen

- Turovets,NA., Agapova,LS., Kopnin,PB., Tulina,NM., Chumakov,PM., Kopnin,BP.: *Effect of inactivating the p33ING1 tumor supressor on the function of cell cycle "checkpoints" and genome stability. Genetika 2000, 36, 385-392.*
- Van den Berg, WB., Miossec P.: *IL-17 as a future therapeutic target for rheumatoid arthritis. Nat Rev Rheum 2009. Vol5(10), 549-553*
- Vieyra,D., Toyama,T., Hara.Y., Boland,D., Johnston,R., Riabowol,K.: *ING1 isoforms differentially affect apoptosis in a cell age-dependent manner.Cancer Res 2002. 62, 4445-4452*
- Weiss,B., Davidkova,G., Zhou,L.-W.: *Antisense RNA gene therapy for studying and modulating biological processes. Cell Mol Life Sci 1999. 55, 334-358.*
- Zeremski,M., Horrigan,SK., Grigorian IA., Westbrook,CA., Gudkov,AV.: *Localization of the candidate tumor supressor gene ING1 to human chromosome 13q34. Somst Cell Mol Genet 1997. 23, 233-236.*
- Zhao,J., Liu,X. ,Li,Z.: *Significance of anti-CCP antibodies in modifikation of 1987 ACR classification criteria in diagnosis of rheumatoid arthritis. Clinical rheumatology 2009*
- Zvaifler,N.J.: *A retrospective analysis of the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Rev Rhe um Engl Ed 1996. 63, 791-796.*

Anhang

Bedanken möchte ich mich bei...

... Herrn Prof. Dr. Ulf Müller-Ladner für die Themenvergabe, für zahlreiche Anregungen und die freundschaftliche Unterstützung und dafür, daß er mich immer wieder motivierte, obwohl es lange gedauert hat

... Frau Dr. Elena Neumann für die praktische und theoretische Unterstützung bei der Durchführung der Experimente und Ihre freundliche Hilfe bei allen Problemen

... Herrn Prof. Dr. Jürgen Schölmerich für die Bereitstellung der Labors im Forschungsbau des Uniklinikums Regensburg

... Herrn Prof. Dr. Joachim Grifka für die gute Zusammenarbeit bei der Gewinnung der Gewebeproben in der Klinik und Poliklinik für Orthopädie in Bad Abbach.

... Martin Judex und Sandra Lechner für die Einarbeitung im Labor und Ihr „offenes Ohr“ bei Fragen

... allen Mitarbeitern im Labor, insbesondere Birgit Riepl und Wibke Ballhorn für ihre intensive Mitarbeit und Unterstützung

... meiner Mutter und meinen Schwiegereltern für die vielseitige Hilfe und liebevolle Kinderbetreuung

... meinem Mann Markus fürs Motivieren und Rücken frei halten - ohne ihn wäre es wohl nichts mehr geworden

... meinen Kindern Josef, Johanna und Maria

... allen Anderen, die mich mit fachlicher Diskussion, Computertipps und Korrekturlesen unterstützt haben, insbesondere meinem Bruder, Martin und Anita Gruber und Dr. Hans Hauner

Anhang

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Christina Gruber